

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**

T E S I S

**AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS DE PLANTAS
TOLERANTES A PLOMO PARA SU POTENCIAL USO EN
FITORREMEDIACIÓN**

Que para obtener el grado de:
Especialista en Biotecnología

P R E S E N T A

I.B.Q. Diana Tania Velázquez Osornio

Asesora:

Dra. Tania L. Volke Sepúlveda

Lector:

M.B. Cesar C. Rojas-Loria

Diciembre de 2011



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00098

Matrícula: 210389068

AISLAMIENTO DE HONGOS
ENDOFITOS DE PLANTAS
TOLERANTES A PLOMO PARA SU
POTENCIAL USO EN
FITORREMEDIACION

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 13 del mes de diciembre del año 2011 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPULVEDA
M.B. CESAR CUAHUTEMOC ROJAS LORIA

siendo el primero asesor de la alumna y , de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: DIANA TANIA VELAZQUEZ OSORNIO

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, se comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



Diana Tania Velazquez Osornio
DIANA TANIA VELAZQUEZ OSORNIO
ALUMNA

REVISÓ

[Signature]
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

[Signature]
DR. RUBEN ROMAN RAMOS

ASESORA

[Signature]
DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPULVEDA

ASESOR

[Signature]
M.B. CESAR CUAHUTEMOC ROJAS LORIA

DEDICATORIA

México D.F. a 13 de Diciembre de 2011

A JUAN

Por formar parte de mi familia, por todo el apoyo y cariño durante todo el tiempo

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la
Unidad Iztapalapa aprobó la idónea comunicación de resultados:

**AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS DE PLANTAS TOLERANTES
A PLOMO PARA SU POTENCIAL USO EN FITORREMEDIACIÓN**

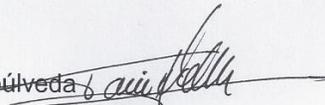
A LOUISA

Que presentó

I.B.Q Diana Tania Velázquez Osornio

Comité Tutorial:

Asesora: Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda



Lector: M.B. César Cuauhtémoc Rojas Loria



DEDICATORIA

A JUAN

Por formar parte de mi familia, por todo el apoyo y cariño durante todo el tiempo

A MIS PAPÁS

Por todo su apoyo a pesar de la distancia

A LOLITA

Porque es muy importante para mí

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Tania Volke Sepúlveda por darme la oportunidad de realizar este proyecto, por su paciencia, apoyo, comprensión y por toda su enseñanza durante todo este tiempo.

Al Dr. Mariano Gutiérrez Rojas por darme sus puntos de vista, consejos y observaciones para mejorar mi trabajo.

A César Loria, por participar en la revisión de éste trabajo, por sus consejos y por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio: César, Olivia, Areli, Caliope, Vicky, Gloria, Bety y Víctor por todo el apoyo y sus consejos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1	RESUMEN	1
2	ABSTRACT	2
3	INTRODUCCIÓN	3
4	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
4.1	<i>Contaminación de suelos por metales</i>	4
4.2	<i>Fitorremediación de suelos contaminados por metales</i>	5
4.3	<i>Influencia de las interacciones en la rizósfera sobre la fitorremediación</i>	8
4.4	<i>Dodonaea viscosa L. Jacq.</i>	12
5	JUSTIFICACIÓN	13
6	HIPÓTESIS	14
7	OBJETIVOS	14
7.1	<i>General</i>	14
7.2	<i>Específicos</i>	14
8	MÉTODOS Y MATERIALES.....	15
8.1	<i>Estrategia Experimental</i>	15
8.2	<i>Muestreo de raíces en un sitio contaminado con plomo</i>	15
8.3	<i>Aislamiento de hongos endófitos</i>	17
8.4	<i>Selección de cepas por pruebas de interacción con D. viscosa</i>	18
8.5	<i>Pruebas de tolerancia y acumulación de Pb por cepas seleccionadas</i>	19
8.6	<i>Identificación morfológica de cepas aisladas</i>	21
8.7	<i>Análisis estadístico</i>	21
9	RESULTADOS	22
9.1	<i>Caracterización de suelos y raíces del sitio de muestreo</i>	22
9.2	<i>Aislamiento de hongos endófitos</i>	24
9.3	<i>Pruebas de interacción planta-hongo</i>	26
9.4	<i>Tolerancia y acumulación de Pb por las cepas seleccionadas</i>	30
9.5	<i>Identificación morfológica de cepas seleccionadas</i>	38
10	CONCLUSIONES	45
11	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Géneros de árboles de donde se muestrearon raíces y claves asignadas	19
Tabla 2. Composición del medio Czapek modificado, usado para las pruebas de tolerancia y acumulación de plomo por los hongos aislados	20
Tabla 3. Claves de las muestras de raíces, coordenadas geográficas y concentración de plomo inicial en raíces y suelo de la rizósfera	23
Tabla 4. Biomasa final de las colonias de las cepas seleccionadas crecidas en medio Czapek modificado adicionado con diferentes concentraciones de plomo	31
Tabla 5. Concentración inhibitoria media (CI_{50}) e índices de tolerancia (IT) obtenidos en función de la concentración de Pb para cada cepa seleccionada	35
Tabla 6. Capacidad de acumulación de Pb en función de la concentración inicial del metal en el medio por las cepas en estudio	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales mecanismos implicados en la fitorremediación de suelos contaminados con elementos tóxicos. En el sistema suelo-planta-microorganismos, un elemento tóxico puede ser transformado y/o acumulado en puntos específicos de dicho sistema	7
Figura 2. Estrategia experimental general por etapas	15
Figura 3. Procedimiento realizado para el aislamiento de hongos endófitos a partir de segmentos de raíz en medio PDA con antibióticos	17
Figura 4. Géneros de arbustos predominantes en los alrededores de la fundidora de la colonia Ávalos (Chihuahua). Las muestras de raíces se obtuvieron de cada arbusto	22
Figura 5. Hongos filamentosos aislados de raíces de <i>Acacia</i> spp. amarilla (AA) y blanca (AB)	24
Figura 6. Hongos filamentosos aislados de raíces de <i>Prosopis</i> sp. (PR)	25
Figura 7. Hongos aislados de raíces de <i>Fraxinus</i> sp. (FR) (a) y de semillas de <i>D. viscosa</i> (DO-S) (b)	25
Figura 8. Efecto de seis cepas fúngicas aisladas de raíces de <i>Acacia</i> sp. blanca (AB) sobre el crecimiento de <i>D. viscosa</i> , 30 días después de la inoculación	27
Figura 9. Prueba cuantitativa de asociación entre plántulas de <i>D. viscosa</i> y una cepa aislada de la raíz de <i>Acacia</i> sp. blanca (AB-2) que no mostró signos de fitopatogenicidad después de 30 días de contacto	28
Figura 10. Producción de biomasa (base seca) de tallos y raíces de <i>D. viscosa</i> por efecto de la inoculación con las diferentes cepas fúngicas seleccionadas	28
Figura 11. Elongación de tallos y raíces de <i>D. viscosa</i> por efecto de la inoculación con las cepas fúngicas seleccionadas	29
Figura 12. Producción de hojas por efecto de diferentes cepas inoculadas en plántulas de <i>D. viscosa</i>	30
Figura 13. Cinética de crecimiento radial (a) y velocidad de crecimiento radial (VCR) promedio (b) para la cepa AA-1 en función de la concentración inicial de plomo en el medio	32
Figura 14. Cinética de crecimiento radial (a) y velocidad de crecimiento radial (VCR) promedio (b) para la cepa DO-S en función de la concentración inicial de plomo en el medio	33
Figura 15. Cinética de crecimiento radial (a) y velocidad de crecimiento radial (VCR) promedio (b) para la cepa AB-2 en función de la concentración inicial de plomo en el medio	33
Figura 16. Cinética de crecimiento radial (a) y velocidad de crecimiento radial (VCR) promedio (b) para la cepa FR-1 en función de la concentración inicial de plomo en el medio	34
Figura 17. Cinética de crecimiento radial (a) y velocidad de crecimiento radial (VCR) promedio (b) para la cepa PR-1 en función de la concentración inicial de plomo en el medio	34
Figura 18. Características morfológicas de la cepa AA-1 (arriba), aislada de raíces de <i>Acacia</i> sp. amarilla. Se observa la morfología colonial en medio PDA (a) y la morfología microscópica de hifas (b) y conidias (c, d). En la parte inferior de la Figura, se muestran imágenes de la morfología colonial (e) y microscópica (f, g) de <i>Penicillium chrysogenum</i> usadas como referencia para la identificación de la cepa	38

- Figura 19.** Características morfológicas de la cepa DO-S (arriba), aislada de semillas de *D. viscosa*. Se observa la morfología colonial en medio PDA (**a**) y la morfología microscópica de hifas y estructuras reproductoras (**b**, **c**). En la parte inferior de la Figura (**e**) se muestra la morfología colonial de *Phialocephala* sp. y la morfología microscópica de *P. urceolata* (**f**) y *P. fortinii* (**g**), usadas como referencia para la identificación de la cepa 39
- Figura 20.** Características morfológicas de la cepa AB-2 (arriba), aislada de raíces de *Acacia* sp. blanca. Se observa la morfología colonial en medio PDA (**a**) y la morfología microscópica de hifas (**b**) y macroconidias (**c**, **d**). En la parte inferior de la Figura (**e**, **f**), se muestran imágenes de la morfología colonial y microscópica de *Bipolaris australiensis* usadas como referencia para la identificación de la cepa 41
- Figura 21.** Características morfológicas de la cepa FR-1 (arriba), aislada de raíces de *Fraxinus* sp. Morfología colonial en medio PDA (**a**), morfología microscópica de conidióforos (**b**), cleistotecio y células “hülle” (**c**) y ascosporas (**d**), características del género *Emericella*. En la parte inferior se muestran las imágenes de referencia para la identificación: morfología colonial (**e**), conidióforo (**f**), células “hülle” (**g**) y ascosporas (**h**) de *Emericella* sp. 42
- Figura 22.** Características morfológicas de la cepa PR-1 (arriba), aislada de raíces de *Prosopis* sp. Morfología colonial en medio PDA a los 5 días de incubación a 30°C (**a**); hifas cenocíticas con vesículas en un cultivo de 24 h (**b**); esporangióforos en un cultivo de 48 h (**c**, **d**); rizoide en un cultivo de 12 días (**e**). En la parte inferior se muestran las imágenes de referencia para la identificación: colonia de *Cunninghamella* sp. (48 h) (**f**), vesículas (**g**), esporangióforos con esporangiolos (**h**) y rizoide (**i**) de *Rhizopus* sp. 43

1 RESUMEN

Durante siglos, la minería en México generó grandes cantidades de residuos que fueron dispuestos inadecuadamente, impactando grandes áreas de suelos con elementos tóxicos, como Pb y Cd. La fitorremediación es una de las pocas alternativas técnica y económicamente factibles para limpiar estos sitios. En tal caso, el proceso implica el uso de plantas y los microorganismos asociados para extraer, transformar y/o estabilizar los metales a través de su acumulación en tejidos aéreos (fitoextracción) o su transformación, reducción de solubilidad o acumulación en raíces (fitoestabilización). Aunque altas concentraciones de metales pueden disminuir la actividad de microorganismos asociados con plantas que crecen en suelos contaminados, hay algunos tolerantes y que pueden mejorar procesos de fitorremediación. Entre ellos, hay hongos que en cierta etapa de su ciclo de vida, se asocian con las raíces y se comportan como endófitos, favoreciendo el crecimiento vegetal y la fitorremediación. Sin embargo, los estudios de fitorremediación relacionados con estos hongos son aún escasos, pero se ha demostrado que tienen un gran potencial para mejorar la aplicabilidad y eficiencia de dicha técnica. La aplicación de este tipo de hongos para mejorar la fitorremediación de metales ha sido retrasada, en parte, debido a la falta de cepas tolerantes a metales tóxicos.

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento de *Dodonaea viscosa*, una planta que tolera y estabiliza plomo, por efecto de la inoculación con hongos endófitos tolerantes a Pb. Para cumplir con el objetivo, el trabajo se dividió en tres etapas. Durante la primera, se aislaron hongos endófitos de raíces de arbustos (*Acacia* spp., *Prosopis* sp. y *Fraxinus* sp.) que crecían en un sitio contaminado con Pb en Chihuahua. En la segunda, se hicieron pruebas cualitativas de interacción entre *D. viscosa* y las cepas aisladas, de donde se seleccionaron las que no resultaron fitopatógenas; con éstas, se realizaron pruebas cuantitativas (x3) sobre el crecimiento vegetal. Finalmente, las cepas se identificaron morfológicamente y se determinó su tolerancia y capacidad de acumulación de Pb.

Se aislaron 52 hongos endófitos de raíces que contenían entre 200 y 500 mg Pb/kg de materia seca (MS), más una cepa de semillas de *D. viscosa*. Del total de los aislados, cinco no resultaron fitopatógenos para la planta. De éstos, dos cepas (AA-1 y DO-S) estimularon significativamente (~100%) la producción de biomasa de raíces y tallos de *D. viscosa* con respecto a plantas sin inocular. Otras dos cepas (AB-2 y PR-1) no causaron cambios significativos en dichas variables, mientras que la cepa FR-1 provocó una reducción significativa en la biomasa de tallos (33%) y de raíces (46%). La tolerancia a Pb para cada cepa se estimó a partir de la velocidad de crecimiento radial (VCR), en términos de la concentración inhibitoria media (CI_{50}). En general, las cepas aisladas de raíces con Pb fueron más tolerantes que la aislada de semillas de *D. viscosa* (DO-S). La CI_{50} , estimada en un rango de concentraciones de 0 a 1500 mg Pb/L, se encontró en el siguiente orden: AB-2 > PR-1 > FR-1 > DO-S > AA-1. De acuerdo con las características morfológicas, se sugiere que la cepa AB-2 pertenece al género *Bipolaris*, PR-1 a *Cunninghamella*, FR-1 a *Emericella*, DO-S a *Phialocephala* y AA-1 al género *Penicillium*. El aislamiento y estudio de hongos endófitos tolerantes con fines de fitorremediación es de gran importancia, ya que su aplicación puede mejorar el crecimiento vegetal y conferirle una serie de ventajas a las plantas, principalmente a través de la reducción del estrés que causa la presencia de elementos tóxicos en el suelo.

2 ABSTRACT

During centuries, the mining in Mexico produced high amounts of wastes that were improperly disposed, impacting large areas of soils with toxic elements such as Pb and Cd. Phytoremediation is one of the few technically and economically feasible alternatives to clean up these sites. In such case, the process involves the use of plants and the associated microorganisms to extract, transform and/or stabilize metals through their accumulation in the aerial tissues (phytoextraction) or their transformation, solubility reduction or accumulation in roots (phytostabilization). Although high concentrations of metals can decrease the activity of microorganisms associated with plants growing in polluted soils, some of them are tolerant and can enhance phytoremediation processes. Among them, there are fungi that at some stage in their life cycle are associated with the roots and behave as endophytes, favoring plant growth and phytoremediation. However, phytoremediation studies related to these fungi are still scarce, but it has been shown to they have great potential to improve the applicability and efficiency of this technique. The application of this type of fungus to improve the phytoremediation of metals has been delayed, partly due to the lack of strains tolerant to toxic metals.

In this context, the aim of this study was to evaluate the growth of *Dodonaea viscosa*, a plant that tolerates and stabilizes lead, by effect of the inoculation with endophytic fungi tolerant to lead. To achieve this aim, the work was divided into three stages. During the first, endophytic fungi were isolated from roots of shrubs (*Acacia* spp., *Prosopis* sp. y *Fraxinus* sp.) growing in a Pb-polluted site in Chihuahua. In the second stage, qualitative tests of interaction between *D. viscosa* and the isolated strains were conducted. Then, we selected the non-phytopathogenic fungi, which were used for quantitative tests (x3) on the plant growth. Finally, the selected strains were morphologically identified and their tolerance and lead accumulation ability were determined.

We isolated 52 endophytes from roots containing between 200 and 500 mg Pb/kg of dry matter (DM), and a strain isolated from seeds of *D. viscosa*. Of all isolates, five were not plant pathogens. From these, two strains (AA-1 y DO-S) significantly stimulated (~100%) the biomass production of roots and shoots of *D. viscosa* with respect to uninoculated plants. Two other strains (AB-2 y PR-1) did not cause significant changes in these variables, while the strain FR-1 significantly reduced the biomass of shoots (33%) and roots (46%). Pb tolerance for each strain was estimated with data from the radial growth rate (RGR) in terms of the half inhibitory concentration (IC₅₀). In general, strains isolated from roots with Pb were more tolerant than that isolated from seeds of *D. viscosa*. IC₅₀ values, estimated at a concentration range from 0 to 1500 mg Pb/L were found in the following order: AB-2 > PR-1 > FR-1 > DO-S > AA-1. According to the morphological characteristics, we suggest that the strain AB-2 belongs to the *Bipolaris* genus, PR-1 to *Cunninghamella*, FR-1 to *Emericella*, DO-S to *Phialocephala* and AA-1 to the *Penicillium* genus. The isolation and study of tolerant fungal endophytes with phytoremediation purposes is of great importance, since their application can improve the plant growth and provide several benefits to the host plants, mainly through the reduction of stress caused by the presence of toxic elements in the soil.

3 INTRODUCCIÓN

En el mundo, los recursos naturales han sufrido fuertes y continuados procesos de degradación debido al aprovechamiento intensivo y al manejo irracional al que han sido sometidos. En México, las actividades del sector industrial han generado grandes impactos en el medio ambiente, particularmente las industrias que generan elevadas cantidades de residuos potencialmente tóxicos como son los metales pesados. La elevada concentración de metales tóxicos que contienen los residuos generados por la industria minera, hace que sea casi imposible realizar una disposición final eficiente de éstos elementos. Además, por varios siglos, los residuos mineros fueron dispuestos de manera inadecuada en el ambiente, principalmente en ríos y suelos. Lo anterior ha generado graves problemas que se ven reflejados en el cambio climático así como en alteraciones a muchos ecosistemas. Estos elementos no se degradan por métodos fisicoquímicos ni biológicos, por lo que surge la necesidad de crear nuevas alternativas que permitan remediar ambientes como suelos, aguas y aire.

La fitorremediación es una alternativa para la remediación de diferentes matrices ambientales como suelos, aguas y sedimentos. Esta tecnología implica el uso de plantas tolerantes y los microorganismos asociados para remover, transformar, degradar o estabilizar contaminantes orgánicos e inorgánicos. En el caso particular de los metales, la fitorremediación implica: (i) la remoción del elemento por su acumulación en tejidos aéreos (**fitoextracción**), o (ii) la estabilización del elemento por su transformación, acumulación en raíces o reducción de la solubilidad (**fitoestabilización**). Ambos procesos pueden mejorarse por la asociación entre plantas y microorganismos (**rizorremediación**). De hecho, la rizorremediación de metales ha ganado atención debido al potencial biotecnológico de ciertos microorganismos para remover elementos tóxicos de medios contaminados y a su posible efecto benéfico sobre el crecimiento vegetal en suelos contaminados. El éxito de este tipo de asociaciones en la recuperación de suelos contaminados depende de la combinación planta-microorganismo-metal.

Entre los microorganismos que interactúan con las raíces, se encuentran los **endófitos**. Recientemente, ha aumentado el uso de estos microorganismos con fines de fitorremediación, ya que éstos confieren un gran potencial adaptativo a las plantas frente a condiciones abióticas adversas. La mayoría de los estudios en el tema se centra en el uso de bacterias, mientras que los estudios con hongos son escasos. No obstante, se sabe que éstos pueden inmovilizar y disminuir el estrés por metales tóxicos, además de mejorar la fitorremediación. Las plantas que toleran y acumulan altas concentraciones de metales tóxicos, pueden albergar en sus tejidos diversos géneros de hongos endófitos tolerantes y con potencial de biorremediación.

4 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Contaminación de suelos por metales

El aprovechamiento de los recursos naturales es la base fundamental para el desarrollo de la humanidad. No obstante, con el tiempo la sobreexplotación de estos recursos se ha incrementado y, en consecuencia, se han generado grandes volúmenes de desechos industriales y urbanos. Lo anterior, aunado al lento desarrollo y a la ineficiencia de las técnicas de manejo, así como a la disposición inadecuada de residuos, ha favorecido la existencia de una gran cantidad de sitios contaminados con residuos que contienen metales pesados, compuestos orgánicos y diversas sustancias peligrosas (Volke-Sepúlveda *et al.* 2005). Existe cierta dificultad para conocer los efectos reales de los contaminantes presentes en el medio ambiente, ya que éstos no necesariamente son letales para los seres vivos pero muchos producen daños a nivel genético o fisiológico, que suelen ser más perjudiciales para la población en general, y pueden causar efectos negativos en el desarrollo o reproducción de los mismos (Navarro-Aviñó *et al.* 2007).

En el caso particular de los metales, éstos no se degradan y sólo pueden ser transformados de un estado químico a otro, por lo que su presencia como contaminantes en los suelos supone un riesgo debido a su potencial lixiviación hacia aguas superficiales y subterráneas, así como por su absorción por las plantas, lo que finalmente, propicia su entrada a la cadena trófica. Cuando la biodisponibilidad de un contaminante es muy alta, tanto los elementos esenciales (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo) como los no esenciales (Cd, Pb, Hg, Cr) pueden ser tóxicos (Gohre y Paszkowski, 2006; Carpena y Bernal, 2007).

En México, la minería y actividad industrial se encuentran entre las fuentes más importantes de contaminación por elementos tóxicos. Los elementos tóxicos más comunes son Pb, Cd, Zn, As, Se y Hg, su acumulación se deriva de los procesos de recuperación como: la pirometalurgia (proceso seco a través de calor); en la cual se llevan a cabo operaciones como: calcinación, tostación, fusión, volatilización, electrólisis y metalotermia. Otro proceso de gran impacto en el ambiente es la hidrometalurgia (proceso húmedo) donde se lleva a cabo lixiviación, purificación, flotación y precipitación. En México una fuente de contaminación por la actividad minera ha sido generada por procesos que se llevan a cabo en beneficio del oro y la plata como lo es la cianuración y amalgamación con Hg, en donde su recuperación de los residuos generados no se lleva a cabo en su totalidad (Gutiérrez y Moreno 1997, SEMARNAT 2004b). El desarrollo de nuevas tecnologías que son obtenidas por actividades minerometalúrgicas; así como del reciclaje de algunos materiales aplicados a la fabricación de equipos (computo, celulares; entre otros) generan un impacto ambiental por el uso de algunos metales para su fabricación como: hierro, cobre, cadmio, oro, plomo y plata, entre otros (Gocht *et al.* 1988).

Otras fuentes que generan contaminación por metales y metaloides son: (i) *drenaje pluvial*, que puede contener concentraciones elevadas de metales, debido a factores que dependen del tipo de camino y material de construcción de los mismos, de la cantidad de tráfico, planeación urbanística y uso de suelo; (ii) *descargas y drenajes industriales* de industrias como la metal-mecánica, baños electroquímicos y de galvanoplastia entre otras; (iii) *drenaje doméstico*, que puede contener metales como Cu, Pb, Zn, Cd, Fe, Mn, Cr, Ni, Co, Bo y As, debido al desprendimiento y lixiviados de los materiales de construcción de las tuberías; (iv) *rellenos sanitarios* en los que muchos de los lixiviados producidos pueden contener metales como Cu, Zn, Pb y Hg; (v) *quema de combustibles fósiles*, es la fuente principal de metales hacia la atmósfera y potencial de contaminación de cuerpos superficiales de agua (Csuros y Csuros 2002).

4.2 Fitorremediación de suelos contaminados por metales

Para saber si es posible remediar un suelo contaminado con elementos tóxicos se deben tomar en cuenta las características de los elementos contaminantes (especie química, concentración, valencia, solubilidad, biodisponibilidad y toxicidad) y las características del sitio (pH, tipo de suelo, temperatura, permeabilidad, y potencial redox) (Volke-Sepúlveda *et al.* 2005). La remediación de un suelo implica realizar un análisis que depende de diversas características importantes que den una solución efectiva (Sellers, 1999), como por ejemplo: para determinar si un sitio requiere ser remediado es importante conocer el tipo de contaminante y las características físicas y químicas del sitio que requiere ser remediado así como la forma en que el contaminante debe ser tratado, estas propiedades determinan cómo puede ser el movimiento del contaminante y si persiste en el ambiente. La estructura química de un contaminante determina su toxicidad y por consiguiente permite fijar ciertos criterios para establecer los límites de limpieza. Otro punto importante por tomar en cuenta es el lugar y sus características así como el uso de suelo (industrial, residencial o agrícola). Las propiedades naturales de los suelos, proporcionan información importante que son útiles para determinar las características específicas del sistema de tratamiento a utilizar. Las tecnologías para la remediación de sitios contaminados están en función de las condiciones específicas de cada sitio. Así mismo estas tecnologías de remediación pueden actuar conteniendo la contaminación, separando el contaminante del suelo o destruyendo el contaminante, dentro de los que se pueden mencionar a los compuestos químicos que se clasifican en orgánicos e inorgánicos (como los metales pesados)(Sellers, 1999). Es importante conocer acerca del tipo de contaminante (orgánico o inorgánico) antes de utilizar algún método de remediación, su concentración y toxicidad, su distribución a través del sitio y el medio en el que se encuentra (agua o partículas de suelo), entre otras (Van Deuren *et al.* 1997).

En el caso particular de los metales pesados, los cuales no pueden destruirse por vía biológica ni fisicoquímica, la remediación de los sitios contaminados con estos elementos debe centrarse en la modificación de su solubilidad, movilidad y/o toxicidad, básicamente a través de cambios en su estado de valencia (Volke-Sepúlveda *et al.* 2005). Una alternativa para la remediación de suelos contaminados con metales, es el uso de tecnologías biológicas (con plantas y/o microorganismos), las cuales representan un potencial en cuanto a costos se refiere ya que, en general, el equipamiento necesario para su implementación es menos caro que el requerido para los tratamientos fisicoquímicos. La combinación de mecanismos biológicos de oxidación-reducción, así como de procesos fisicoquímicos-biológicos, también representa una opción prometedora para la remediación de suelos contaminados con metales tóxicos y para el procesamiento de minerales. Sin embargo, estas alternativas aún se encuentran poco estudiadas y desarrolladas para los suelos, condiciones climáticas y problemas específicos de nuestro país (Volke-Sepúlveda *et al.* 2005).

Una de las pocas alternativas biológicas eficientes para remediar suelos contaminados con metales, es la fitorremediación. La fitorremediación es una tecnología que utiliza plantas vivas y los microorganismos asociados a su rizósfera para la remediación de suelos, lodos, sedimentos y aguas contaminados a través de la remoción, degradación o estabilización de los contaminantes (Pilon-Smits, 2005). En los últimos años, esta alternativa ha ganado aceptación para tratar suelos contaminados con elementos tóxicos, debido a que es una tecnología estética y amigable con el ambiente, es altamente rentable, no invasiva y además ofrece efectividad para tratar un amplio rango de contaminantes, ya que las plantas pueden estabilizar, extraer, y/o volatilizar diferentes elementos tóxicos (Pilon-Smits, 2005).

Para la fitorremediación de un sitio en particular deben considerarse diversos aspectos como la especie de planta, su capacidad para tolerar cantidades elevadas de elementos tóxicos en el suelo, así como su capacidad para captar cantidades significativas de los contaminantes presentes en el suelo (Brunet *et al.* 2008). Los mecanismos involucrados en el proceso de fitorremediación requieren de un crecimiento vegetal abundante y, en cualquier caso, la especie vegetal utilizada debe ser tolerante al contaminante (Smith y Bradshaw, 1970). Vangrosveld (1998), demostró que con el uso de dos plantas tolerantes (*Agrostis capillaris* y *Festuca rubra*) se logró la revegetación de un sitio contaminado por la actividad piro-metalúrgica en Bélgica.

Cuando la fitorremediación es aplicada a suelos contaminados por metales pesados se lleva a cabo bajo diversos mecanismos: **fitoextracción**, la **fitoestabilización**, **fitovolatilización** y la **rizorremediación** (Figura 1). Estos mecanismos pueden aplicarse para remediar sitios contaminados por metales y metaloides, elementos radiactivos y contaminantes orgánicos. De esta manera los contaminantes son asimilados por las plantas, secuestrados en sus vacuolas

y/o fijados a estructuras celulares insolubles como la lignina (López *et al.* 2004). A continuación se detalla cada uno de los mecanismos mencionados.

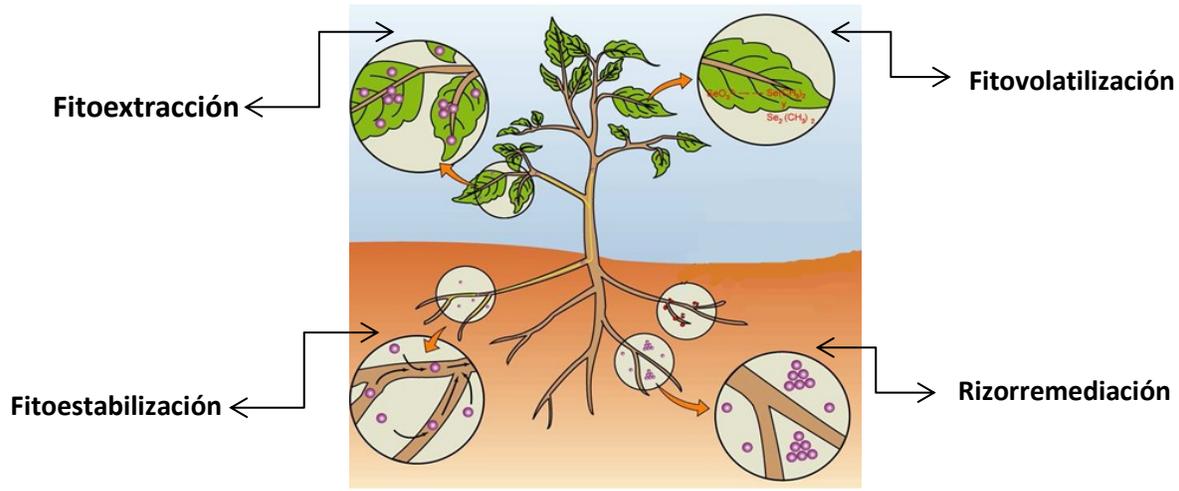


Figura 1. Principales mecanismos implicados en la fitorremediación de suelos contaminados con elementos tóxicos. En el sistema suelo-planta-microorganismos, un elemento tóxico puede ser transformado y/o acumulado en puntos específicos de dicho sistema (Buchanan *et al.* 2000).

Fitoextracción o fitoacumulación. Es un mecanismo que consiste en la absorción de los contaminantes a través de las raíces y su concentración en las partes cosechables de las plantas. Los contaminantes extraídos son principalmente metales pesados (Jian *et al.* 1997), aunque también se ha usado para ciertos contaminantes orgánicos y elementos radiactivos (Dushenkov, 2003). Generalmente los sistemas de fitoextracción se implementan para extraer metales de suelos contaminados con el uso de plantas que acumulan altas concentraciones de contaminante en su parte aérea, conocidas como hiperacumuladoras (López *et al.* 2004).

Fitoestabilización. Se refiere al uso de plantas que, por la composición de sus exudados, reducen la biodisponibilidad de los contaminantes presentes en el suelo evitando así su transporte a capas subterráneas o a la atmósfera, y mejorando las propiedades físicas y químicas del suelo. Otro mecanismo de fitoestabilización implica la fijación o inmovilización de los contaminantes del suelo por su acumulación en las raíces de las plantas. Otros procesos involucrados en la inmovilización incluyen el secuestro, la lignificación y la humificación (López *et al.* 2004). Eapen *et al.* (2003) reporta el uso de plantas de *Brassica juncea* y *Chenopodium amaranticolor* para remover uranio (U) de soluciones con bajas y altas concentraciones, de las cuales, el U fue absorbido en un 90% por las raíces.

Fitovolatilización. Algunas plantas son capaces de transformar y volatilizar elementos o compuestos volátiles, como mercurio y selenio, presentes en suelos, sedimentos o agua. Tales contaminantes son absorbidos, metabolizados, transportados desde las raíces a las partes aéreas y liberados a la atmósfera. El proceso ocurre a medida que las plantas en crecimiento absorben agua junto con los contaminantes solubles. Algunos de los contaminantes pueden llegar hasta las hojas y evaporarse o volatilizarse a la atmósfera. Por ejemplo, se ha encontrado que los álamos pueden volatilizar hasta un 90 % del tricloroetileno que absorben (Núñez *et al.* 2004).

Rizorremediación. Es un mecanismo que utiliza plantas con alta tasa de crecimiento y área superficial para absorber, concentrar y precipitar contaminantes. Las raíces de las plantas liberan exudados que ayudan al crecimiento y supervivencia de los microorganismos presentes en el suelo, lo que da como resultado un mejoramiento en la degradación y/o estabilización de los contaminantes (Kuiper *et al.* 2004). Como parte de sus actividades metabólicas y fisiológicas, las plantas liberan en sus exudados azúcares simples, aminoácidos, compuestos alifáticos y aromáticos, enzimas y oxígeno, y los transportan desde su parte aérea hasta sus raíces, favoreciendo el desarrollo de comunidades microbianas en el suelo circundante. Particularmente la actividad metabólica de hongos y bacterias puede conducir a la mineralización de contaminantes orgánicos (López *et al.* 2004).

En los mecanismos involucrados en la fitorremediación (Figura 1), las plantas son utilizadas como sistemas directos de descontaminación, a través de la modificación del contaminante por medio de la absorción, secuestro o acumulación. Como sistema indirecto los microorganismos de la rizósfera se asocian con las raíces de las plantas para actuar sobre los contaminantes (Stomp *et al.* 1994). Para la remediación de suelos contaminados con metales, las técnicas de fitorremediación más empleadas han sido la fitoextracción y la fitoestabilización (Carpén-Bernal, 2007).

A pesar de considerarse una tecnología muy prometedora y factible para la remediación de suelos, aún existe una serie de limitantes para su implementación, lo que conduce a la necesidad de desarrollar nuevas estrategias. En este sentido, el efecto de interacciones entre plantas y microorganismos sobre los metales ha ganado atención debido al potencial biotecnológico de los microorganismos para remover metales directamente de medios contaminados y a su posible efecto benéfico en el crecimiento vegetal en suelos contaminados (Deng *et al.* 2011).

4.3 Influencia de las interacciones en la rizósfera sobre la fitorremediación

Hasta ahora, el papel que juegan los microorganismos en la fitorremediación no es claro (Zhuang *et al.* 2007), lo que hace importante generar información acerca de los mecanismos implicados en la tolerancia, exclusión, acumulación y movilización de metales por micro-

organismos relacionados con las plantas y su relación con plantas fitorremediadoras. Se sabe que estos microorganismos modifican todos estos procesos, afectando directamente la captación y/o exclusión de los metales por las plantas (Zhuang *et al.* 2007; Kidd *et al.* 2009). El comportamiento de los metales en un suelo influye en el éxito de la fitorremediación y es posible modificarlo mediante la manipulación de asociaciones planta-microorganismos. El uso de este tipo de asociaciones actúa modificando de diferentes maneras el comportamiento de un elemento tóxico en el suelo. Por un lado, pueden estimularse procesos de biomineralización¹, como la formación de precipitados metálicos insolubles por interacciones con productos del metabolismo microbiano (Barkay y Schaefer, 2001) lo cual puede mejorar el crecimiento vegetal en suelos muy contaminados y aumentar la inmovilización de metales para su fitoestabilización. La actividad en esta zona puede también conducir a un aumento en la disponibilidad de los metales para su captación por plantas, favoreciendo un proceso de fitoextracción (Kidd *et al.* 2009; Kavamura y Esposito, 2010).

Los microorganismos presentes en el suelo tienen una gran área de contacto con los metales favoreciendo la detención de mecanismos que forman parte importante en la acumulación de metales por parte de los microorganismos como: adsorción, precipitación, formación de complejos así como el transporte activo hacia las células. Por otro lado algunos parámetros fisicoquímicos como el pH, la composición iónica y los factores biológicos son de gran importancia para la acumulación de metales. (Ledin, 2000).

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). La asociación que se presenta de forma natural entre los microorganismos de la rizósfera y las raíces de las plantas, ha despertado el interés de muchos grupos de investigación que, durante los últimos años, se han enfocado en el estudio del papel que desempeñan estas asociaciones en la transformación y especiación de los contaminantes presentes en el ambiente (Debarati *et al.* 2005).

Entre los microorganismos del suelo, los hongos (micorrícicos y no micorrícicos) desempeñan un papel importante en la degradación, utilización y transformación de sustratos orgánicos e inorgánicos. Así mismo, éstos juegan un papel importante en los ciclos biogeoquímicos de los elementos, así como en los aspectos químicos y biológicos involucrados. De tal manera, los hongos se encuentran íntimamente involucrados en la regulación de procesos que tienen implicaciones importantes para los organismos vivos y el medio ambiente (Gadd, 2004).

¹ Formación de minerales metálicos por acción de metabolitos producidos por microorganismos (p.ej. oxalatos).

4.3.1 El papel de hongos endófitos micorrícicos

Considerando que el 80% de las plantas están asociadas con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y que éstos pueden modificar el efecto tóxico de los metales sobre el crecimiento vegetal, estos hongos pueden ser considerados como un elemento importante para el crecimiento de las plantas. Los HMA juegan un papel como bioprotector de las plantas, ya que reducen el daño ocasionado por condiciones de estrés biótico y abiótico, incluyendo patógenos del suelo y contaminantes como metales. Una alternativa para mejorar la fitorremediación de un sitio contaminado con elementos tóxicos, es el aislamiento y caracterización tanto de plantas como de cepas HMA propias del sitio contaminado, donde los aislados fúngicos tolerantes podrían usarse para el establecimiento y supervivencia de plantas en sitios contaminados por metales, así como ser utilizadas como herramientas fundamentales en los procesos de fitorremediación (Rivera-Becerril, 2006).

A la fecha, existen numerosas investigaciones acerca de la influencia de ciertos microorganismos sobre la fitorremediación de suelos contaminados por metales pesados, particularmente se ha estudiado el efecto de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) y de hongos micorrícicos arbusculares (HMA). Por ejemplo, Rivera-Becerril (2006), evaluó el efecto de la inoculación de diversas plantas con RPCV y HMA, observando que ambos grupos microbianos se complementaron en funciones como la disolución de fósforo, fijación de nitrógeno y producción de fitohormonas, además de favorecer un incremento en la absorción de nutrientes por la planta.

A pesar de que existe una gran cantidad de estudios relacionados con el papel de HMA y RPCV sobre la fitorremediación de elementos tóxicos, los estudios enfocados hacia el papel de hongos filamentosos no micorrícicos sobre el mejoramiento de los procesos de fitorremediación de metales son escasos. No obstante, 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). Por ejemplo, Arriagada *et al.* (2007), probaron el efecto de la inoculación de *Glomus deserticola* el cual es un hongo micorrícico y *Fusarium concolor* sobre el potencial de *Eucalyptus globulus* para acumular Pb. Este grupo encontró que la inoculación con ambos hongos favoreció (casi el doble) la acumulación del metal presente en un suelo contaminado con residuos mineros, con respecto a la planta no inoculada. Entre los mecanismos que influyen 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 volatilización (Gadd, 1993).

4.3.2 El papel de hongos endófitos no micorrícicos

Dentro de los hongos endófitos no micorrícicos se encuentran hongos filamentosos de las divisiones *Basidiomycota* y *Ascomycota*. El término endófito se conoce desde el siglo XIX y se usó inicialmente para agrupar aquellos organismos que viven dentro de la mayoría de especies de plantas (Bacon, 1977). Son organismos simbióticos (hongos o bacterias) que habitan dentro de los tejidos de una planta sin causar síntomas de enfermedad. Recientemente, se ha puesto atención al uso de endófitos con fines de fitorremediación, ya que confieren gran potencial adaptativo a las plantas hospederas frente a condiciones abióticas adversas, como la mejora en el crecimiento vegetal, tolerancia a sequía y salinidad, al estrés oxidativo, y a suelos ácidos con alto contenido de Zn y Al, entre otras (Abello y Kelemu, 2006; Doty, 2008).

Los hongos endófitos son organismos que viven en el interior de las plantas durante la mayor parte o todo su ciclo de vida, se encuentran en las hojas y los tallos de muchas plantas. Viven en los espacios intercelulares y, algunas veces, intracelularmente en hojas, tallos y flores, absorbiendo nutrientes de la planta. Pueden desarrollar diferentes tipos de simbiosis, como el comensalismo y mutualismo que no producen síntomas de enfermedad en la planta, ya que una vez dentro del tejido, inician un estado latente, ya sea durante toda la vida de la planta o por un período prolongado de tiempo, hasta que las condiciones ambientales sean favorables para el hongo o las condiciones en la planta cambian dando ventaja al hongo (parasitismo) (Sieber, 2007). La interacción entre hongos endófitos y plantas depende de factores genéticos (planta y hongo), ambientales (agua) y bióticos (microorganismos, patógenos). En combinación, estos factores determinan si la simbiosis es mutualista o parasítica (Müller y Krauss, 2005). En esta asociación, el hongo recibe de la planta nutrientes y protección, mientras que los beneficios para la planta son indirectos y más complejos. Entre éstos se encuentra el aumento de la biomasa aérea y raíces, el número de brotes, la producción de semillas y la tolerancia al estrés biótico y abiótico (Müller y Krauss, 2005). Este tipo de hongos produce metabolitos que pueden proteger a la planta contra herbívoros, éstos pueden también proveer protección contra la depredación de semillas mediante la producción de toxinas. A cambio reciben alimento, un lugar donde vivir y, en algunos casos, dispersión a través de la semilla de su hospedero (Johnson *et al.* 1985; Clay, 1998; Knoch *et al.* 1993).

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). El estudio de las interacciones hongo-planta con fines de fitorremediación está recibiendo mayor atención en el campo científico. Adams *et al.* 2007 y Arriagada *et al.* 2007 han demostrado que la inoculación de ciertas plantas con hongos que se comportan como endófitos, como *Trichoderma harzianum* y

Fusarium concolor, además de estimular el crecimiento vegetal, mejoran la acumulación de metales en las raíces (fitoestabilización). En otros casos, este tipo de hongos también puede aumentar la translocación de metales a la parte aérea en plantas tolerantes, lo cual implica un importante potencial para su aplicación para fitoextracción (Cao *et al.* 2008; Jiang *et al.* 2008). Así, el mejoramiento en la eficiencia de la fitorremediación puede ser resultado de una mejor nutrición, la protección contra patógenos o la acumulación de metales tóxicos en estructuras específicas. A la fecha, los estudios enfocados a fitorremediación con hongos endófitos son escasos, pero dada la utilidad de los hongos en la biorremediación, su potencial es claro (Porrás-Alfaro y Bayman, 2011).

El uso de hongos endófitos aplicados en los diversos mecanismos de fitorremediación ha ganado gran importancia en los últimos años; sin embargo, es necesario continuar realizando investigación en este campo para generar información que ayude a explicar los mecanismos que favorecen la rizorremediación y fitoestabilización de suelos contaminados con elementos tóxicos con la aplicación de interacciones entre plantas con potencial fitorremediador y hongos tolerantes al contaminante en particular. De esta manera, puede ser posible la manipulación de pares planta-microorganismos que ayuden a los procesos de fitorremediación aplicables en cada caso en particular.

4.4 *Dodonaea viscosa* L. Jacq.

Dodonaea viscosa L. Jacq. es un arbusto resinoso perennifolio con una altura de 1 a 5 m, de la familia *Sapindaceae*, ampliamente distribuido en zonas tropicales, subtropicales y templadas. Es una especie demandante de luz y muy tolerante a la sequía, viento, inundaciones y heladas, que puede crecer en suelos muy erosionados, en un rango de temperaturas de 17 a 30°C (Camacho *et al.* 1992). Esta especie se utiliza para el control de la erosión, como barrera rompe-vientos y como restaurador de suelos (Camacho *et al.* 1992), además de que se ha demostrado que puede crecer en suelos contaminados con residuos mineros (Gutiérrez-Rojas *et al.* 2009). Rojas-Loria (2010), utilizando un suelo modelo contaminado, demostró el potencial de esta planta para fitoestabilizar plomo en sus raíces cuando creció sola y en asociación con un hongo filamentoso del género *Lewia*, encontrando que esta cepa favoreció un aumento significativo (~3 veces mayor) en la acumulación de plomo en raíces de esta planta, respecto a las plantas que no fueron inoculadas con el hongo (de ~2000 a ~6000 mg Pb/kg).

5 JUSTIFICACIÓN

La necesidad de desarrollar nuevas tecnologías para la remediación de suelos contaminados con metales tóxicos ha conducido a la aplicación y mejoramiento de tecnologías biológicas como la fitorremediación. La fitorremediación es una de las pocas opciones para tratar suelos contaminados con elementos tóxicos. Un factor clave que incide sobre la eficiencia de esta tecnología son los microorganismos que se asocian con las plantas fitorremediadoras. Hasta ahora, muchos estudios han demostrado el efecto benéfico de rizobacterias y hongos micorrícicos sobre la fitorremediación de suelos contaminados con metales, pero los estudios enfocados hacia el papel de hongos no micorrícicos, como los endófitos, son escasos. Sin embargo, se ha demostrado que éstos hongos toleran y detoxifican metales, además de mejorar el desarrollo vegetal y procesos como la fitoextracción o la fitoestabilización. Además de sus efectos benéficos sobre las plantas, los endófitos tienen un gran potencial biotecnológico para mejorar la aplicabilidad y la eficiencia de la fitorremediación. Así, un mayor entendimiento de las características de hongos endófitos resistentes a elementos tóxicos es un prerequisite indispensable para el desarrollo de estrategias de fitorremediación efectivas para metales

El potencial de la aplicación de microorganismos endófitos para mejorar la fitorremediación de metales ha sido retrasado por la falta de cepas tolerantes a metales tóxicos. Lo anterior, aunado a la rentabilidad y eficiencia de la fitorremediación como alternativa para la remediación de suelos contaminados con elementos tóxicos, genera la necesidad de buscar nuevas especies de hongos endófitos que favorezcan el proceso, así como el crecimiento y salud de las plantas.

Con base en lo anterior, contar con cepas de hongos tolerantes que se asocian con plantas potencialmente fitorremediadoras, es de gran importancia para el desarrollo de estrategias de fitorremediación efectivas para metales tóxicos. Así, el aislamiento y caracterización de nuevas cepas de hongos endófitos puede permitir mejorar la eficiencia de la fitorremediación de suelos contaminados con metales mediante la manipulación de asociaciones específicas entre plantas fitorremediadoras y hongos, con la gran ventaja de que estos últimos son fácilmente cultivables.

6 HIPÓTESIS

Al menos una cepa de un hongo endófito aislada a partir de raíces de árboles que crecen en un sitio contaminado con plomo podrá usarse con fines de fitorremediación, debido a su tolerancia al metal y a su capacidad para mejorar el crecimiento de *Dodonaea viscosa*.

7 OBJETIVOS

7.1 General

Evaluar el crecimiento de *Dodonaea viscosa* por efecto de la inoculación con hongos endófitos que sean tolerantes a Pb.

7.2 Específicos

- Aislar hongos endófitos a partir de raíces de árboles que crecen en un sitio contaminado con plomo.
- Determinar la capacidad de los hongos aislados para interactuar con *D. viscosa* en condiciones *in vitro*.
- Seleccionar al menos una cepa que sea capaz de interactuar con *D. viscosa* y evaluar su efecto sobre el crecimiento de la planta.
- Evaluar la capacidad de tolerancia y acumulación de plomo de la(s) cepa(s) seleccionada(s)
- Identificar morfológicamente las cepas tolerantes que interactúen con *D. viscosa*.

8 MÉTODOS Y MATERIALES

8.1 Estrategia Experimental

Para la realización de este trabajo, la fase experimental se realizó en tres etapas (Figura 2). En la **Etapa 1** se aislaron hongos endófitos a partir de raíces de arbustos que crecían en un sitio contaminado con plomo, posteriormente se realizaron pruebas de interacción con *D. viscosa* con cada una de las cepas aisladas. Durante la **Etapa 2**, se seleccionaron las cepas que interactuaron con *D. viscosa* para llevar a cabo pruebas cuantitativas (x3). Finalmente, en la **Etapa 3**, se evaluó la tolerancia y capacidad de acumulación de Pb por las cepas seleccionadas en la etapa anterior y se procedió a su identificación morfológica macro- y microscópica.

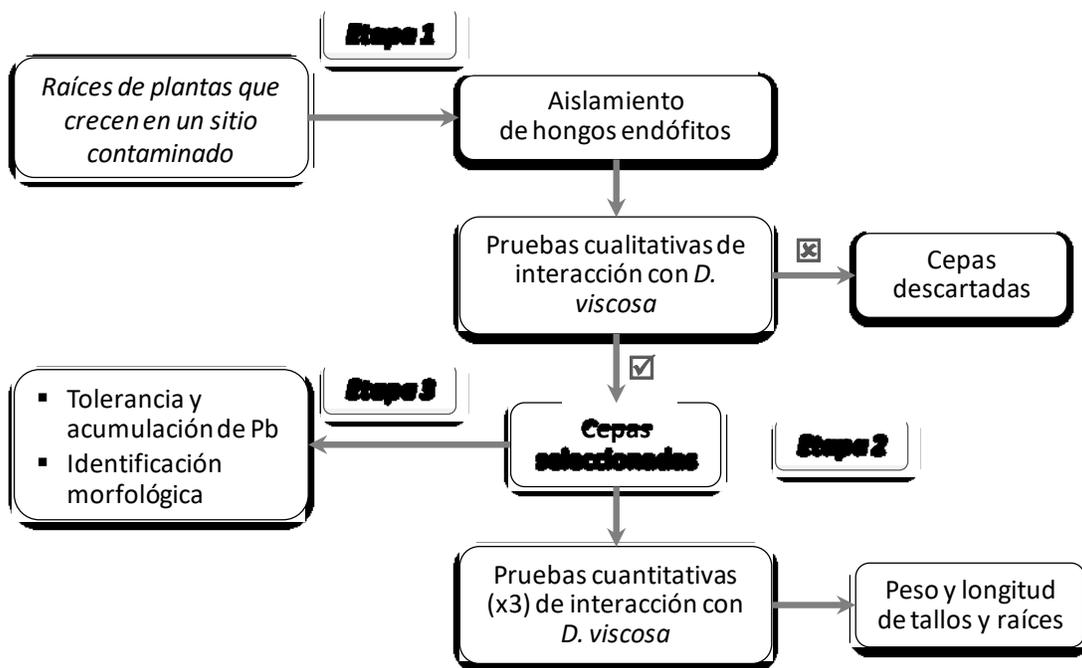


Figura 2. Estrategia experimental general por etapas. ✓ indica interacción positiva y ✗ indica efectos adversos sobre el crecimiento de la planta.

8.2 Muestreo de raíces en un sitio contaminado con plomo

Para la obtención de los hongos endófitos se llevó a cabo un muestreo en los alrededores de la planta fundidora de Ávalos en la ciudad de Chihuahua, Chihuahua (altitud: 1424 m; N 28° 36' 52.5", W 106° 0' 30.2"). Se tomaron muestras de raíces de árboles de los géneros *Prosopis* sp., *Acacia* spp. (amarilla y blanca) y *Fraxinus* sp. Dichas especies se encontraron como predominantes en la zona contaminada con plomo. Las raíces se mantuvieron en refrigeración (4°C) hasta su tratamiento para el aislamiento de hongos endófitos. Asimismo, se tomaron

muestras del suelo de la rizósfera de cada arbusto muestreado, con el fin de caracterizarlas en cuanto a su contenido de plomo total y soluble.

8.2.1 Análisis de muestras de suelo

Para determinar la concentración de plomo en el suelo del sitio de muestreo, se tomaron muestras compuestas (suelo superficial y suelo a 20 cm de profundidad) de suelo. Éstas se secaron en una estufa a 60°C durante 24 h y se trataron como se describe a continuación, para cuantificar el contenido de plomo soluble y plomo total. En ambos casos, las determinaciones se realizaron por triplicado.

Plomo soluble. Para cuantificar el plomo soluble, se pesó 1 g de suelo seco y se le agregaron 10 mL de agua desionizada (18 MΩ cm⁻¹, PURELAB Option-Q, *Elga*). Las muestras se mantuvieron en agitación (150 rpm) a 30°C durante 24 h. Las muestras se filtraron (Whatman 42) y la concentración de plomo soluble en el sobrenadante se cuantificó por espectrometría de absorción atómica (*Shimadzu*, modelo AA-6300) a una longitud de onda de 283.3 nm.

Plomo total. Para cuantificar el contenido total de plomo en las muestras de suelo, éstas se sometieron a un proceso de digestión ácida asistida por microondas (CEM, MARSXpress). Para lo anterior, se pesaron 0.5 g de suelo seco y se adicionaron 10 ml de ácido nítrico concentrado. Las muestras se digirieron a una potencia de 1600 W y 175°C durante 15 min. Las muestras digeridas se aforaron a 25 mL con agua desionizada y, posteriormente, se filtraron con una membrana de nitrocelulosa (Whatman 42). La concentración de plomo en las muestras se cuantificó por espectrometría de absorción atómica (EAA) a 283.3 nm. La curva patrón para la cuantificación de Pb se preparó 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*).

8.2.2 Análisis de muestras de raíces

Para el análisis de plomo en las muestras de raíces obtenidas en el sitio contaminado, se cortaron segmentos de aproximadamente 1 cm que se mantuvieron en agitación (150 rpm) a 30°C en una solución de EDTA (20 mM) durante 2 h, con el fin de eliminar el Pb extracelular. Las raíces se secaron a 60°C durante 24 h. Para el análisis de plomo, a 0.1 g de raíces secas se le adicionaron 5 mL de ácido nítrico concentrado (*J.T. Baker*) y 4 mL de agua desionizada. Las muestras fueron digeridas durante 15 min en el digestor de microondas. Cada muestra se filtró con membranas de 0.45 µm (GN-6 *Metricell*), se aforó con agua desionizada y se analizó por EAA. Cada muestra de raíz se analizó por duplicado.

8.3 Aislamiento de hongos endófitos

Para el aislamiento de hongos endófitos, las raíces obtenidas del sitio contaminado se trataron como se describe a continuación (Lucero *et al.* 2006). Las raíces se cortaron en fragmentos de ~3 cm, Se enjuagaron con agua corriente y se mantuvieron en agitación durante 20 minutos en una solución de detergente comercial (2%). Posteriormente, éstas se desinfectaron mediante su inmersión en las siguientes soluciones: etanol (70%, 1 min), hipoclorito de sodio (12%, 10 min) y nuevamente etanol (70%, 1 min). Entre cada solución, los fragmentos de raíz se enjuagaron repetidamente con agua destilada estéril.

Una vez desinfectadas, las raíces se colocaron en una caja Petri con agua destilada estéril (1 caja por muestra de raíz) para cortarlas en segmentos de ~1 cm y evitar su deshidratación durante el proceso. Con el fin de revisar la eficacia del proceso de esterilización superficial o desinfección, cada segmento se presionó sobre medio PDA estéril y se retiró para colocarlo en el medio para el aislamiento. Se colocaron 4 segmentos de raíz en una caja con medio PDA adicionado con antibióticos (100 mg/L de tetraciclina y 50 mg/L estreptomycin) y se incubaron a 30°C por 2 semanas (Figura 3).

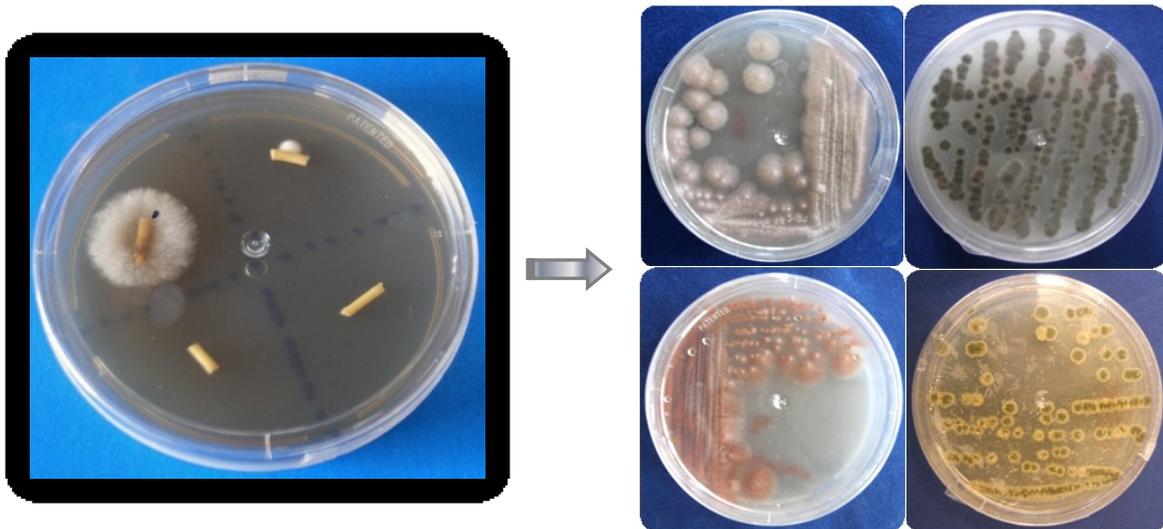


Figura 3. Procedimiento realizado para el aislamiento de hongos endófitos a partir de segmentos de raíz en medio PDA con antibióticos.

Diariamente, se realizaron observaciones y se registró el tiempo que tardó cada hongo en crecer a partir de los segmentos de raíz. Cuando se observó crecimiento fúngico, se tomó el micelio y se realizó una resiembra por estría en medio PDA (1/4 con rosa de bengala (9.75 g de PDA y 1 mL de RB) para limitar la tasa de crecimiento, lo que permitió asegurar el aislamiento de los hongos. Una vez que se logró el aislamiento, los hongos se conservaron en medio PDA a 4°C.

8.4 Selección de cepas por pruebas de interacción con *D. viscosa*

Para seleccionar las cepas fúngicas que pueden interactuar con *D. viscosa*, se utilizaron semillas maduras de este arbusto recolectadas en los alrededores de un sitio contaminado con residuos mineros en el estado de Guanajuato. Éstas se secaron a temperatura ambiente y se almacenaron en bolsas de papel hasta su utilización para la obtención de plántulas. Para la selección de cepas, primero se realizó una prueba cualitativa de interacción. Las cepas que no tuvieron un efecto negativo en el crecimiento de *D. viscosa*, fueron seleccionadas para llevar a cabo una prueba cuantitativa sobre el crecimiento de la planta.

8.4.1 Obtención de plántulas de *D. viscosa*

Para la obtención de plántulas de *D. viscosa*, las semillas se escarificaron térmicamente con el fin de acelerar su germinación, 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., se enjuagaron hasta eliminar el detergente y se colocaron en una solución de etanol (70%) por 30 seg. Finalmente, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio comercial (12%) por 25 min. Las semillas se enjuagaron con agua destilada estéril entre cada procedimiento. Las semillas escarificadas y desinfectadas se sembraron en tubos de cultivo (*Pyrex*) (25 x 150 mm) con medio Murashige-Skoog (MS, Sigma), sacarosa (10 g/L, Sigma) y Phytigel (2 g/L, Sigma) y se germinaron a 25°C en ausencia de luz. Una vez germinadas, las semillas se colocan en una cámara de crecimiento a 25°C, con un fotoperiodo de 16 h, durante 15 días más.

8.4.2 Prueba cualitativa

Los tubos que contenían las plántulas de *D. viscosa* de 15 días de edad se inocularon por piquete con cada cepa aislada. Los tubos se colocaron en una cámara de crecimiento a 25°C, con un fotoperiodo de 16 h durante 30 días más. Como controles se usaron tubos de cultivo con la planta sin inocular. Después de 30 días de contacto planta-hongo, se seleccionaron las cepas que no mostraron efectos adversos evidentes (mediante la inspección visual) sobre el crecimiento vegetal (ej. Clorosis) o las que lo favorecieron. Con estas cepas seleccionadas, se procedió a realizar las pruebas cuantitativas, así como la identificación morfológica.

8.4.3 Prueba cuantitativa

Las pruebas cuantitativas se llevaron a cabo de la misma manera que las cualitativas, pero el contacto planta-hongo se mantuvo durante 45 días. Para determinar efectos significativos por la

presencia del hongo, las pruebas cuantitativas se corrieron por triplicado. Al cabo del periodo de incubación se cuantificó la biomasa (base seca) y elongación de tallos y raíces por separado. La biomasa de *D. viscosa* se determinó mediante el peso seco de tallos y raíces; el tejido vegetal fue retirado de los tubos con medio MS y después se separaron tallos y raíces. Posteriormente fueron lavados con agua destilada, se colocaron en papel filtro a peso constante, se pesaron las muestras (peso inicial) y después se metieron a secar a una estufa a 60° C durante 48 h, luego del secado las muestras se metieron a un desecador durante 2 h y finalmente se pesaron (peso final). Como controles se usaron tubos de cultivo con la planta sin inocular.

8.5 Pruebas de tolerancia y acumulación de Pb por cepas seleccionadas

Las pruebas de tolerancia a plomo se realizaron con cinco cepas fúngicas seleccionadas por su interacción con *D. viscosa*. De estas cinco cepas, dos fueron aisladas de las raíces de *Acacia* spp. (AA-1, AB-2), una de las raíces de *Prosopis* sp. (PR-1), una de *Fraxinus* sp. (FR-1) y una de semillas de *D. viscosa* (DO-S). En la Tabla 2 se muestra una relación de las claves asignadas a las cepas seleccionadas.

Tabla 1. Géneros de árboles de donde se muestrearon raíces y claves asignadas

<i>Género de árbol</i>	<i>Clave de las cepas</i>
<i>Acacia</i> sp. (amarilla)	AA-1
<i>Acacia</i> sp. (blanca)	AB-2
<i>Prosopis</i> sp.	PR-1
<i>Fraxinus</i> sp.	FR-1
<i>D. viscosa</i>	DO-S

8.5.1 Medio de cultivo

Las pruebas de tolerancia para cada cepa fúngica se realizaron con medio Czapek modificado (Tabla 2), adicionado con diferentes concentraciones de plomo (0, 500 y 1000 y 1500 mg/L) en forma de $Pb(NO_3)_2$. El contenido de nitrato aportado por el $Pb(NO_3)_2$ se igualó en todos los medios con $NaNO_3$. El medio fue suplementado con extracto de malta (2 g/L), el pH se ajustó a 5 con HNO_3 0.5 M y, como agente solidificante, se utilizó Phytigel (2.2 g/L).

El medio de cultivo se esterilizó (121°C, 15 min) y se vació a cajas Petri estériles. Una vez que el medio se enfrió y solidificó, en cada caja se colocó una membrana de celofán estéril (que se sumergieron en agua estéril, para facilitar su manejo), con el objeto de facilitar el desprendimiento y recuperación de la biomasa producida al final del periodo de cultivo. Cada caja de Petri se

inoculó en el centro con un disco de micelio (5 mm) tomado de la periferia de una colonia crecida en medio PDA. Los cultivos se incubaron a 30°C durante el periodo adecuado para cada cepa. Cada concentración de Pb se evaluó por triplicado.

Tabla 2. Composición del medio Czapek modificado, usado para las pruebas de tolerancia y acumulación de plomo por los hongos aislados.

Componente	Concentración (g/L)
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30.0
NH ₄ NO ₃	1.4
KH ₂ PO ₄	0.5
MgSO ₄	1.0
KCl	0.5
Sol. Oligoelementos	2 mL

8.5.2 Cuantificación de la tolerancia y acumulación de plomo

La tolerancia de cada cepa a la presencia de diferentes concentraciones de plomo se cuantificó mediante la estimación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀)² y el índice de tolerancia (IT) en cajas de Petri con medio Czapek modificado, adicionado con diferentes concentraciones de Pb (0, 500 y 1000 y 1500 mg/L).

La CI₅₀ se estimó en una curva dosis-respuesta como la concentración de plomo en la cual, la velocidad de crecimiento radial (VCR) disminuyó 50% con respecto al máximo valor obtenido (Naumann *et al.* 2007). El IT se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación, utilizando la VCR como variable de respuesta (Li *et al.* 2011a):

$$IT (\%) = \frac{VCR \text{ en medio} + Pb}{VCR \text{ en medio} - Pb} \times 100$$

Un IT < 100 indica una disminución neta del crecimiento y sugiere estrés en el organismo, un IT ~100 indica que no hay efecto en el crecimiento por la presencia del metal. Un IT > 100% indica una respuesta adaptativa a cierta concentración de un contaminante, conocida como hormesis, que induce un bajo nivel de estrés y activa mecanismos que mejoran la capacidad de la planta para resistir condiciones más severas de estrés (Audet y Charest, 2007).

El crecimiento radial se estimó tomando dos mediciones de la colonia cada 24 h; la VCR se calculó como la pendiente durante la etapa de crecimiento lineal, normalmente cuatro o cinco puntos de la curva. Para estimar la biomasa producida al final del periodo de incubación, la

² Concentración de Pb en la cual, la producción de biomasa y/o el crecimiento radial disminuye 50% con respecto al máximo obtenido.

biomasa de cada caja se separó de la membrana de celofán, se lavó con una solución de EDTA (30 mM) durante 24 h a 30°C (150 rpm), para eliminar el Pb adsorbido. La biomasa de cada caja se filtró (Whatman 42), se secó a 60°C durante 24 h y se registró el peso. Las muestras fueron digeridas en el digestor de microondas con 5 mL de ácido nítrico concentrado y 4 mL de agua desionizada y el plomo acumulado se cuantificó por espectrometría de absorción atómica (EAA).

8.6 Identificación morfológica de cepas aisladas

La identificación de las cepas seleccionadas se llevó a cabo mediante observaciones morfológicas macro- y microscópicas con el uso de microcultivos (Larone, 1993), cuya preparación se describe a continuación. Los microcultivos con los hongos aislados se realizaron cortando cuadros de PDA de 1 cm de lado y 3 mm de espesor con un bisturí estéril. El cuadro de PDA se colocó en un portaobjetos que se ubicó sobre una varilla de vidrio doblada en forma de "V" en una caja de Petri de vidrio (previamente esterilizada) y papel filtro. Posteriormente, el hongo se inoculó por piquete en cada uno de los extremos del cuadro de PDA y se cubrió con un cubreobjetos ejerciendo una ligera presión.

Para mantener la humedad del medio se agregó agua destilada estéril. Las cajas se incubaron a 30°C durante 24 y 48 horas, dependiendo de la velocidad de crecimiento de cada cepa. Una vez que se observó crecimiento sobre el medio, se realizaron las observaciones al microscopio (PRO IMAGEN-PLUS) cada 12 h. Para la observación al microscopio, se desprendió el cubreobjetos del medio y se colocó en un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol. La preparación se selló para su conservación y posteriormente fueron observadas en un microscopio óptico (OLIMPUS BX-53) con un aumento de 10X y 40X.

Para la identificación macroscópica, cada hongo se inoculó por piquete en el centro de una caja Petri con medio PDA. Una vez que se obtuvieron colonias de aproximadamente 5 cm se procedió a su comparación con respecto a la bibliografía (Barnett y Hunter, 1998).

8.7 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos, se utilizó el paquete estadístico SAS. Para determinar si existen diferencias entre tratamientos se utilizó una prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

9 RESULTADOS

9.1 Caracterización de suelos y raíces del sitio de muestreo

Como se mencionó, anteriormente para la obtención de hongos endófitos, se colectaron raíces de arbustos que crecían de forma abundante en un sitio contaminado con plomo en los alrededores de la fundidora localizada en la colonia Ávalos en la ciudad de Chihuahua (altitud: 1424 msnm). Además de las raíces, obtenidas a una profundidad aproximada de 20 cm a partir de la superficie, se colectaron muestras compuestas del suelo de la rizósfera de cada arbusto, en un diámetro de 20 cm alrededor de las raíces. Las especies de arbustos más abundantes en la zona pertenecen a los géneros *Prosopis* (mezquite), *Acacia* (huizache) y *Fraxinus* (fresno). Cabe mencionar que se muestrearon raíces de un arbusto de cada género, con excepción de *Acacia*, del cual se muestrearon raíces de dos especies diferentes, una con flores amarillas y otra con flores blancas (Figura 4).



Figura 4. Géneros de arbustos predominantes en los alrededores de la fundidora de la colonia Ávalos (Chihuahua). Las muestras de raíces se obtuvieron de cada arbusto.

Las muestras de raíces colectadas de cada arbusto se clasificaron como: AA (*Acacia* sp. amarilla), AB (*Acacia* sp. blanca), PR (*Prosopis* sp.) y FR (*Fraxinus* sp.) (Tabla 1). Como parte de la caracterización inicial de las raíces de estos arbustos, así como del suelo rizosféricos, se

determinó el contenido de plomo en ambas matrices (Tabla 3). El pH de las muestras de suelo se encontró alrededor de 7.6.

Tabla 3. Claves de las muestras de raíces, coordenadas geográficas y concentración de plomo inicial en raíces y suelo de la rizósfera.

Género	Clave	Coordenadas	Pb total en suelo (mg/kg PS) ^a	Pb en raíces (mg/kg PS)
<i>Acacia</i> spp.	AB	N 28° 36' 52.5" W 106° 0' 30.2"	10554.0 ± 52.1	539.2
	AA	N28° 36' 50.8" W 106° 0' 32.8"	9121 ± 171.2	197.6 ± 37.2
<i>Prosopis</i> sp.	PR	N 28° 36' 51.8" W 106° 0' 33.3"	10651.8 ± 926.2	393.9 ± 43.0
<i>Fraxinus</i> sp.	FR	N 28° 36' 51.7" W 106° 0' 33.1"	9360.3 ± 762.0	307.2

^a PS indica peso seco (60°C, 48 h).

De acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo (VI), mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio (DOF, 2007), la concentración de referencia total de Pb para un suelo de uso agrícola/residencial es de 400 mg/kg y de 800 mg/kg para uso industrial. Para el caso de Pb soluble, la concentración de referencia es de 0.5 mg/L. Como puede verse (Tabla 3), en general, la concentración total de plomo en el suelo donde se muestrearon las raíces superó 9000 mg/kg de peso seco (PS), con una concentración promedio de Pb soluble de 2.8 ± 1.4 mg/L. En ambos casos, las concentraciones de plomo superan los límites establecidos por la NOM-147, por lo que el sitio de muestreo puede considerarse un sitio contaminado que debería ser remediado.

En el caso de las raíces, se encontró que la concentración total de plomo osciló entre 198 y 540 mg/kg PS. La muestra de raíz en la que se encontró la mayor concentración de plomo fue la correspondiente a *Acacia* sp. blanca (AB), por lo que los hongos aislados de éstas podrían ser más tolerantes al metal. Debido a los altos niveles de plomo total en el sitio, puede decirse que las especies de arbustos presentes en esa zona, son tolerantes a plomo. En general, hay una clara correlación entre las plantas que habitan lugares con altas concentraciones de elementos tóxicos y su capacidad para tolerarlos (Hildebrandt *et al.* 1999). En principio, los géneros de arbustos encontrados en este lugar podrían ser potencialmente utilizados con fines de fitorremediación o revegetación de sitios contaminados con plomo, ya que son tolerantes a este elemento en particular. Comúnmente, para tal fin, se utilizan especies de comunidades vegetales encontradas en el sitio contaminado (Krämer, 2005).

9.2 Aislamiento de hongos endófitos

De las muestras de raíces colectadas, se aisló un total de 52 cepas de hongos filamentosos. De éstas, 4 se obtuvieron de las raíces de *Acacia* sp. amarilla (AA) y 38 de la especie blanca (AB) (Figura 5). Ocho cepas se aislaron de la raíz de *Prosopis* sp. (Figura 6), una de la raíz de *Fraxinus* sp. (Figura 7a). Además de las cepas aisladas de las raíces del sitio contaminado, se aisló una cepa más a partir de semillas de *D. viscosa* (Figura 7b).

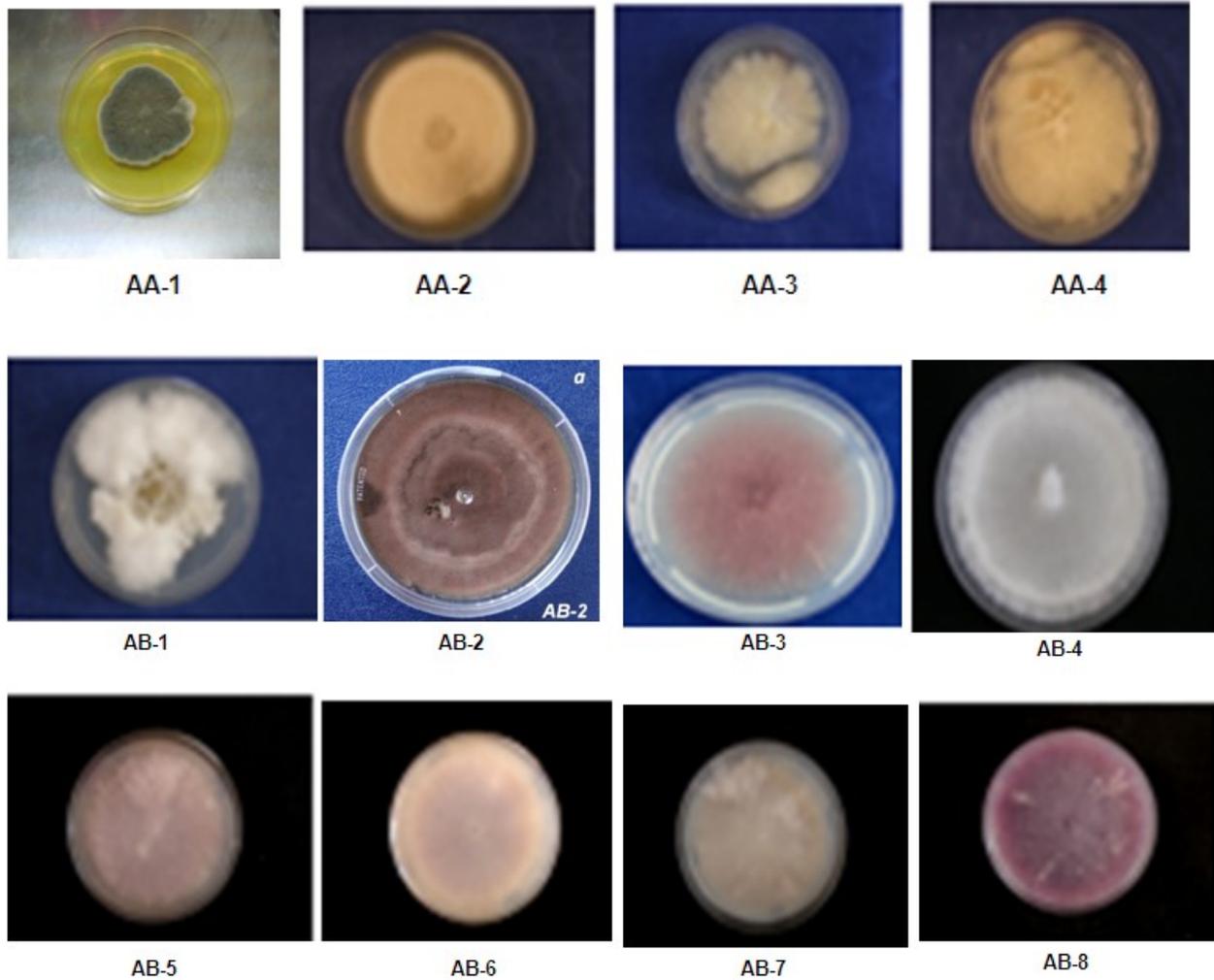


Figura 5. Hongos filamentosos aislados de raíces de *Acacia* spp. amarilla (AA) y blanca (AB).

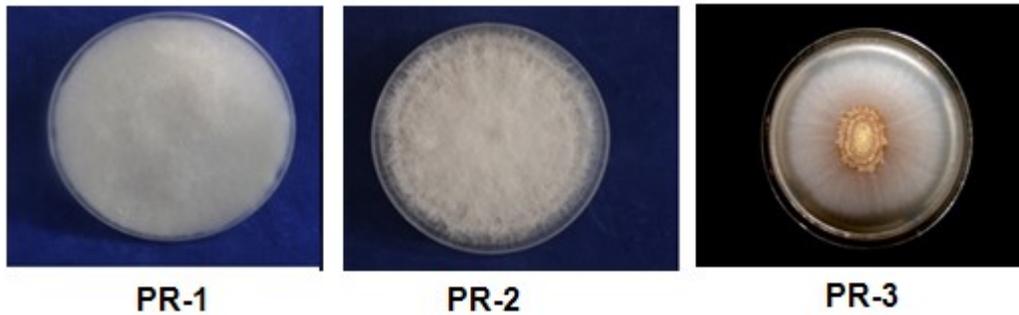


Figura 6. Hongos filamentosos aislados de raíces de *Prosopis* sp. (PR).

Cada especie de planta tiene una comunidad de endófitos, se calculan alrededor de 90 especies en una hoja de un árbol tropical y más de 50 géneros diferentes asociados con las raíces de un pasto de clima árido. La tasa de colonización varía de <1 a 41% en 2 mm² de una hoja de árboles de ecosistemas boreales y árticos, hasta 90% en hojas de árboles tropicales (Porras-Alfaro y Bayman, 2011). En trabajos realizados por Li *et al.* (2011a) se logró aislar 495 hongos endófitos a partir de 690 segmentos de tallos y hojas de seis especies de plantas en un sitio contaminado con Pb y Zn. Este grupo encontró que los tallos albergaban más especies de hongos endófitos que las hojas, encontrando un grado de colonización significativamente mayor (82%) en los tallos que en las hojas (47%).

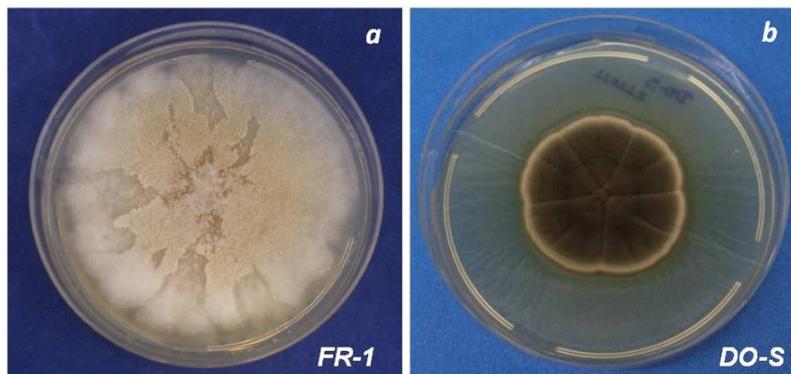


Figura 7. Hongos aislados de raíces de *Fraxinus* sp. (FR) (a) y de semillas de *D. viscosa* (DO-S) (b).

Con base en lo anterior, es posible que el bajo número de aislados obtenidos en nuestro estudio, se deba al tipo de tejido muestreado. Además, muchas especies de hongos endófitos de raíces no esporulan en cultivo (Porras-Alfaro y Bayman, 2011), por lo que una buena parte de los endófitos de los arbustos muestreados pudo no ser cultivable.

Entre los microorganismos que se asocian con las plantas, se encuentran los **rizosféricos**, que habitan sobre o alrededor de las raíces (Doty, 2008). El papel de estos microorganismos en la

fitorremediación aún no se comprende del todo, pero se sabe que modifican la solubilidad, movilidad y disponibilidad de metales en el suelo, afectando directamente su adsorción y/o exclusión por las plantas (Zhuang *et al.* 2007; Kidd *et al.* 2009). Los microorganismos pueden afectar el éxito de la fitorremediación de dos maneras: i) reduciendo la toxicidad de los metales por la disminución de la acumulación en los tejidos aéreos de las plantas, o ii) mejorando el crecimiento vegetal y/o acumulación de metal por una disminución en el estrés debido a la toxicidad de los metales (Lebeau *et al.* 2008). El éxito de las asociaciones rizosféricas en la recuperación de los suelos contaminados depende de la combinación planta-microbio-metal y es influenciada por las condiciones particulares del suelo (Göhre y Paszkowski, 2006; Gadd, 2007).

Dentro de este tipo de microorganismos que interactúan con las plantas, tenemos a los **endófitos**. Algunos de éstos viven asintóticamente dentro de tejidos vegetales sanos, durante parte o todo su ciclo de vida (Gamboa-Gaitán, 2006). Estos se encuentran en todas las plantas y constituyen un grupo diverso (Li *et al.* 2011a). Actualmente, los organismos endófitos han ganado gran importancia 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). Los hongos endófitos establecen una asociación con la planta, en la cual, la planta le proporciona al hongo hospedaje, alimento y protección, mientras que el hongo le confiere a la planta gran potencial adaptativo frente a condiciones abióticas adversas, a través de una mejora en su crecimiento, un aumento en su tolerancia a la sequía y salinidad, al estrés oxidativo y a la acidez, entre otros (Abello y Kelemu, 2006; Doty, 2008). No obstante, aunque hay varios estudios que han demostrado una mejora en el crecimiento vegetal por efecto de hongos endófitos en suelos contaminados con metales, los estudios al respecto son escasos.

Así, el aislamiento de hongos endófitos abre amplias posibilidades para el estudio de interacciones planta-endófito como una alternativa que además le confiere a las plantas mayor resistencia a condiciones adversas (Abello y Kelemu, 2006).

9.3 Pruebas de interacción planta-hongo

Con el propósito de seleccionar las cepas que interaccionaron de manera positiva con la planta, en primer lugar, se realizaron pruebas cualitativas en donde se observó el efecto de éstas sobre el crecimiento y desarrollo de la planta. Después de 30 días de contacto, se seleccionaron las cepas que no afectaron de forma significativa o bien estimularon el desarrollo de la planta. En una segunda etapa, las cepas seleccionadas, se inocularon en el medio donde crecía *D. viscosa* (x3) con el fin de cuantificar el efecto de cada cepa sobre el crecimiento de la planta.

9.3.1 Pruebas cualitativas

Para las pruebas cualitativas de interacción entre plántulas de *D. viscosa*-hongo, se utilizaron las 52 cepas aisladas. Durante los 30 días de contacto planta-hongo, se comparó el crecimiento de las plantas inoculadas con cada cepa con el crecimiento de plantas sin inocular (Figura 8).

Como puede verse en la figura 8, algunas de las cepas aisladas tuvieron un efecto positivo y otras un efecto negativo sobre el crecimiento de la planta. La cepas que resultaron fitopatógenas para *D. viscosa* fueron descartadas. De las 52 cepas aisladas, se seleccionaron cinco que no resultaron fitopatógenas para la planta, con las cuales se llevaron a cabo pruebas cuantitativas de interacción. Se seleccionó una cepa de la raíz de *Acacia* sp. amarilla (AA-1), una de la raíz de *Acacia* sp. blanca (AB-2), una de *Prosopis* sp. (PR-1) una de *Fraxinus* sp. (FR-1) y una más de semillas de *D. viscosa* (DO-S).

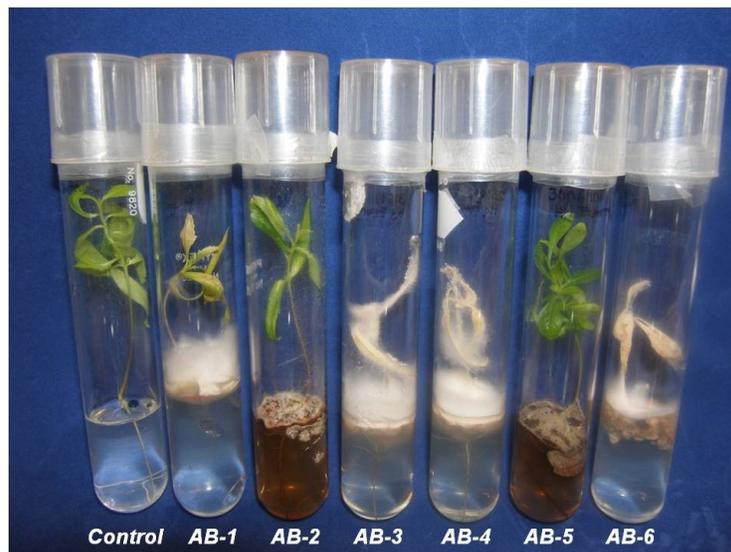


Figura 8. Efecto de algunas cepas fúngicas aisladas de raíces de *Acacia* sp. blanca (AB) sobre el crecimiento de *D. viscosa*, 30 días después de la inoculación. El control corresponde a una plántula sin inocular.

9.3.2 Pruebas cuantitativas

Como se mencionó, las pruebas cuantitativas se realizaron inoculando por triplicado cada cepa seleccionada durante la etapa anterior en plántulas de *D. viscosa* de 15 días (Figura 9).

Al final del periodo de cultivo (30 días) se corroboró que las cinco cepas seleccionadas (AA-1, AB-2, PR-1, FR-1 y DO-S) no afectaron, o bien, favorecieron significativamente el crecimiento de *D. viscosa*, cuantificado a través de la elongación y producción de biomasa de tallos y raíces (Figuras 10 y 11), así como de la formación de hojas (Figura 12).

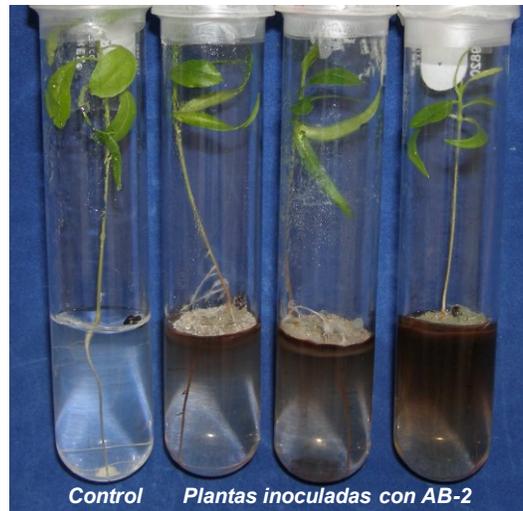


Figura 9. Prueba cuantitativa de asociación entre plántulas de *D. viscosa* y una cepa aislada de la raíz de *Acacia sp.* blanca (AB-2) que no mostró signos de fitopatogenicidad después de 30 días de contacto.

Como puede observarse (Figura 10), se encontró que la producción de biomasa en raíces y tallos de *D. viscosa*, fue estimulada significativamente (más de 2 y 3 veces, respectivamente) con respecto a las plantas control por efecto de las cepas probadas AA-1 y DO-S.

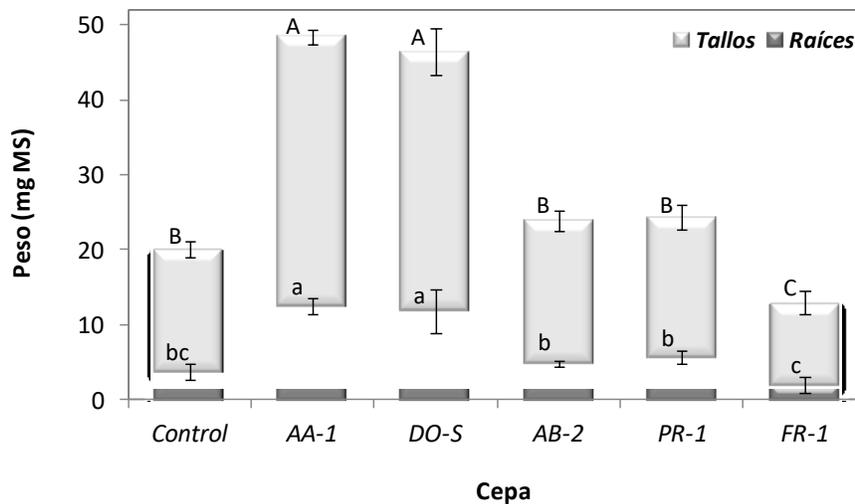


Figura 10. Producción de biomasa (base seca) de tallos y raíces de *D. viscosa* por efecto de la inoculación con las diferentes cepas fúngicas seleccionadas. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes. Letras mayúsculas y minúsculas indican un ANOVA independiente para tallos y raíces (prueba de Duncan, $\alpha = 0.05$; $n = 3$).

Las cepas AB-2 y PR-1 no provocaron cambios significativos en la producción de biomasa de la planta, mientras que en las plantas inoculadas con la cepa FR-1 hubo una reducción significativa (33 y 46% menos peso en tallos y raíces, respectivamente) en ambas variables con respecto a las

plantas control. De acuerdo con Abello y Kelemu (2006), una de las ventajas que los hongos endófitos proporcionan a las plantas es justamente el estímulo en la producción de biomasa en las plantas con las que se asocian. En este tipo de relaciones planta – hongo, el hongo recibe de la planta nutrientes y protección, mientras el hongo favorece el crecimiento de la planta, reflejado en un aumento de la biomasa aérea y raíces, el número de brotes y la producción de semillas (Müller y Krauss; 2005). En cuanto la longitud de tallos y raíces, en todos los casos se registró una ligera disminución con respecto al tratamiento control (Figura 11).

El hecho de que solamente cinco de los 52 hongos aislados causaron un efecto positivo o neutro en el crecimiento de *D. viscosa*, podría atribuirse a que algunos endófitos son específicos para su huésped (Porrás-Alfaro y Bayman, 2011). Es decir, solamente son benéficos y/o pueden crecer específicamente con una especie de planta. No obstante, un estudio realizado por Rojas-Loria (2010) sobre la interacción de *Lewia* sp., un ascomiceto encontrado como endófito de *Festuca arundinacea* (Crúz-Hernández, 2008), y *D. viscosa*, demostró una asociación entre ambas especies, observando el contacto entre las hifas de *Lewia* sp. y las células parenquimáticas de la raíz de la planta.

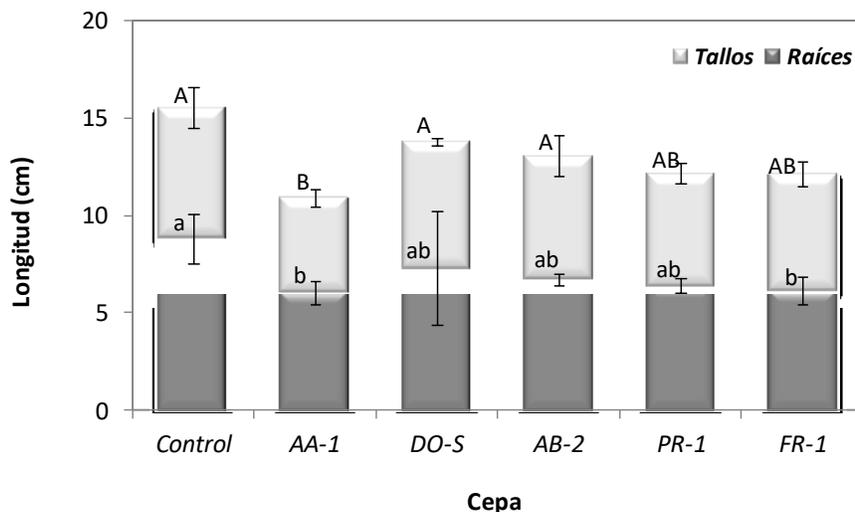


Figura 11. Elongación de tallos y raíces de *D. viscosa* por efecto de la inoculación con las cepas fúngicas seleccionadas. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes. Letras mayúsculas y minúsculas indican un ANOVA independiente para tallos y raíces (prueba de Duncan, $\alpha = 0.05$; $n = 3$).

Otra variable cuantificada como una medida del crecimiento, fue el número de hojas producidas por las plántulas (Figura 12). Se encontró que la inoculación de plántulas de *D. viscosa* con las cepas AA-1 y DO-S no tuvo efecto significativo sobre la producción de hojas. En contraste, las cepas AB-2, PR-1 y FR-1 provocaron una disminución significativa en dicha variable, encontrando una reducción de casi el doble con respecto a las plantas control.

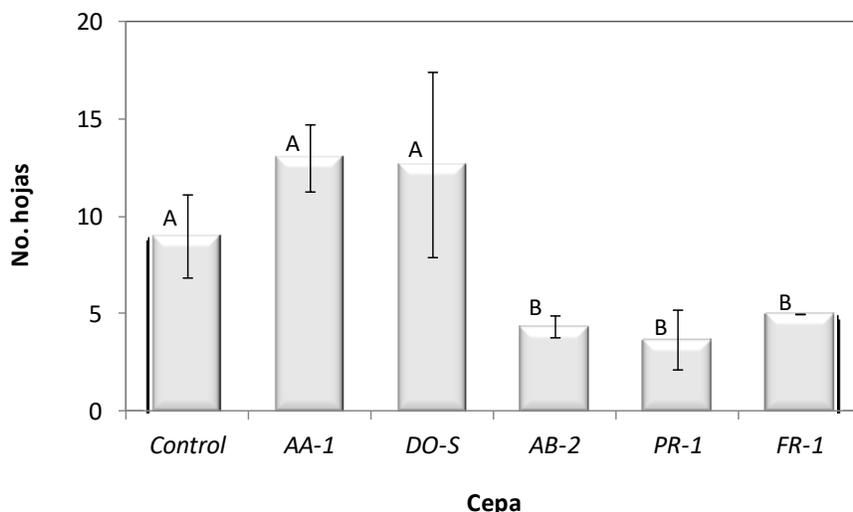


Figura 12. Producción de hojas por efecto de diferentes cepas inoculadas en plántulas de *D. viscosa*. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (prueba de Duncan, $\alpha = 0.05$; $n = 3$).

En las interacciones entre plantas y microorganismos, la producción de ciertas moléculas por parte de ambos organismos son determinantes para la asociación. Por ejemplo, las hojas, tallos y raíces de plantas de alfalfa son colonizados por diferentes hongos que producen diferentes tipos de metabolitos secundarios (Porrás-Alfaro y Bayman, 2011). Asimismo, metabolitos con actividad antimicrobiana son de gran importancia para las defensas de las plantas (Díaz-Puentes, 2009). Existen microorganismos de naturaleza saprófita o simbiótica que desempeñan funciones importantes en cuanto al crecimiento y nutrición vegetal; entre ellos, hay especies a las que se le atribuyen propiedades como el estímulo de la absorción de nutrientes por parte de las plantas (Barea *et al.* 1984; Diederichs y Moawad, 1993). Un ejemplo de esto son los hongos micorrízicos arbusculares que, además de incrementar la biomasa vegetal influyen sobre la proporción en la cual se distribuye entre la parte aérea y las raíces (Smith, 1980).

9.4 Tolerancia y acumulación de Pb por las cepas seleccionadas

9.4.1 Tolerancia a Pb

La presencia de metales en un suelo puede ejercer efectos tóxicos para los organismos que lo habitan. Por tal razón, cuando un organismo entra en contacto con cualquier tipo de contaminante, se activan mecanismos que le permiten tolerar su presencia. En cualquier caso, la capacidad de un microorganismo o una planta para fitorremediar un suelo depende de su tolerancia al contaminante en particular. Entre los microorganismos que interactúan con las plantas, los hongos filamentosos destacan por su capacidad para sobrevivir, crecer y prosperar

en lugares contaminados con metales a través de mecanismos que evitan el estrés y contribuyen a la tolerancia (Bellion *et al.* 2006; Gadd, 2007).

La tolerancia en un organismo a la presencia de elementos tóxicos, como el plomo, puede estimarse a través de variables como la biomasa total, la tasa de crecimiento y, en el caso de plantas además, la longitud de brotes y raíces. De hecho, algunos iones metálicos en el entorno de un organismo pueden actuar como un factor de estrés que causa cambios fisiológicos o, en casos extremos, una inhibición completa del crecimiento (Baker, 1987). En el presente estudio, se cuantificó la biomasa final producida (Tabla 4) y la VCR (Figuras 13 a 17) para cada cepa seleccionada como variables para determinar la tolerancia a plomo.

Tabla 4. Biomasa final de las colonias de las cepas seleccionadas crecidas en medio Czapek modificado adicionado con diferentes concentraciones de plomo, en un periodo de 5-20 días.

Pb (mg/L)	Biomasa (mg PS)*				
	AA-1	DO-S	AB-2	FR-1	PR-1
0	16.8 ± 4.0 ^a	87.7 ± 13.4 ^a	98.7 ± 6.8 ^a	51.9 ± 11.1 ^b	59.9 ± 5.7 ^{ab}
500	32.7 ± 9.3 ^a	97.5 ± 27.0 ^a	63.4 ± 8.2 ^b	54.9 ± 13.1 ^b	52.4 ± 1.4 ^b
1000	39.8 ± 14.7 ^a	96.4 ± 24.6 ^a	61.6 ± 3.9 ^b	77.5 ± 2.3 ^a	66.5 ± 3.2 ^a
1500	28.4 ± 23.7 ^a	117.7 ± 13.8 ^a	64.6 ± 0.1 ^b	76.6 ± 3.8 ^a	55.1 ± 6.5 ^b
<i>Pr>F</i>	0.3720	0.3306	0.0006	0.0118	0.0636

* Medias con la misma letra por columna no son significativamente diferentes (Duncan, $\alpha = 0.05$; $n = 3$). En la última fila se muestra la significancia del ANOVA.

9.4.1.1 Producción de biomasa

Una de las variables utilizadas para estimar la tolerancia de cada cepa a la presencia de Pb fue la producción de biomasa. Al evaluar el efecto del Pb sobre la producción de biomasa de la cepa AA-1, se encontró que el metal estimuló ligeramente su producción con respecto al control y se mantuvo sin diferencias significativas al aumentar la concentración (Tabla 4). Para la cepa DO-S no se encontraron cambios significativos en la producción de biomasa por efecto de ninguna concentración de Pb probada. En la cepa AB-2 se observó una disminución significativa en la producción de biomasa por efecto del Pb en todas las concentraciones probadas, aunque es importante notar que la variable no cambió significativamente con el aumento de la concentración de Pb. En contraste con las cepas anteriores, la biomasa fue la variable más sensible a la presencia de Pb. En la cepa FR-1, la biomasa registró un incremento significativo en presencia de 1000 y 1500 mg Pb/L. Esta respuesta podría atribuirse a que bajo una condición de estrés, en este caso el Pb, aunque la VCR disminuye la biomasa crece de manera más densa, registrándose un aumento. Para la cepa PR-1, aunque se registró una ligera disminución en la producción de biomasa por efecto del Pb, las diferencias no fueron significativas.

9.4.1.2 Velocidad de crecimiento radial (VCR)

La tolerancia se expresó en términos de la concentración inhibitoria media (CI_{50}), calculada a partir de los datos obtenidos de la VCR (Tabla 5). La cepa AA-1 (Figura 13) no mostró diferencias significativas en la VCR con respecto al control sin Pb cuando creció con 500 mg Pb/L. Sin embargo, al aumentar la concentración de Pb en un rango de 1000 a 1500 mg/L, la variable disminuyó 31.3 y 56.4% con respecto al control. Los resultados indican que para esta cepa, la VCR es una variable más sensible que la producción de biomasa para estimar una CI_{50} .

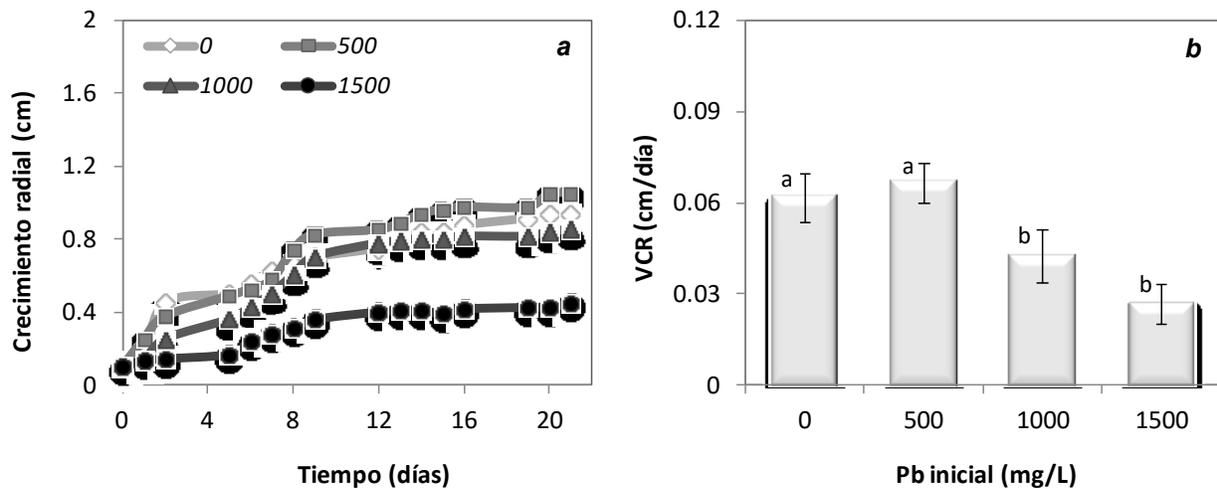


Figura 13. Cinética de crecimiento radial (a) y velocidad de crecimiento radial (VCR) promedio (b) para la cepa AA-1 en función de la concentración inicial de plomo en el medio. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan, $\alpha = 0.05$; $n = 3$).

Para la cepa DO-S, la VCR (Figura 14) se vio estimulada por la presencia de Pb en un rango de 0 a 1000 mg/L, mientras que con 1500 mg Pb/L, ésta disminuyó casi 28% con respecto al control. En este caso, la VCR también resultó ser la variable más sensible a la presencia de Pb.

En la cepa AB-2, la concentración de Pb no modificó significativamente la VCR con respecto al control (Figura 15). En contraste con las cepas anteriores, para esta cepa la biomasa fue la variable más sensible a la presencia de Pb.

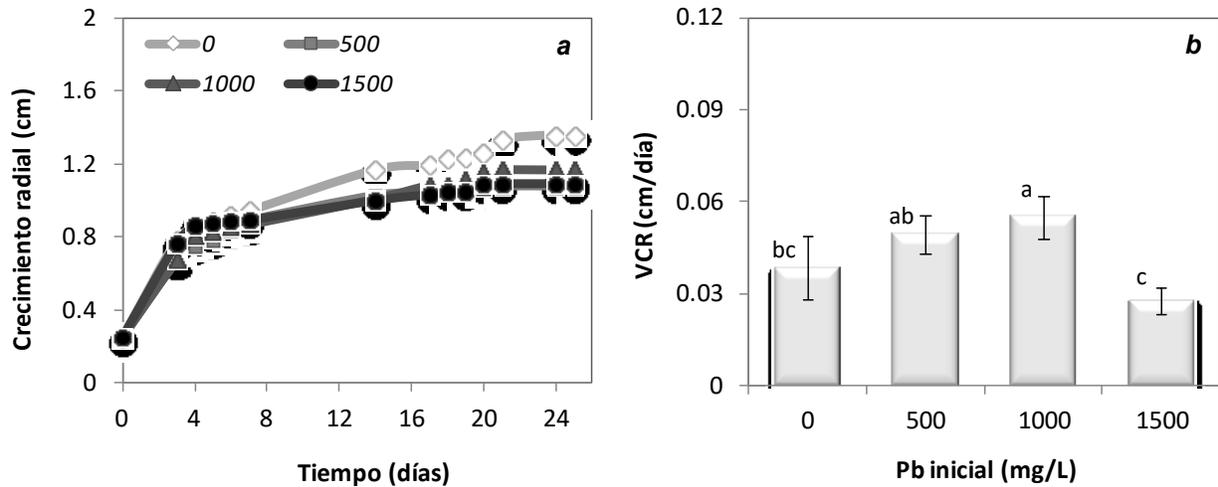


Figura 14. Cinética de crecimiento radial (a) y velocidad de crecimiento radial (VCR) promedio (b) para la cepa DO-S en función de la concentración inicial de plomo en el medio. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan, $\alpha = 0.05$; $n = 3$).

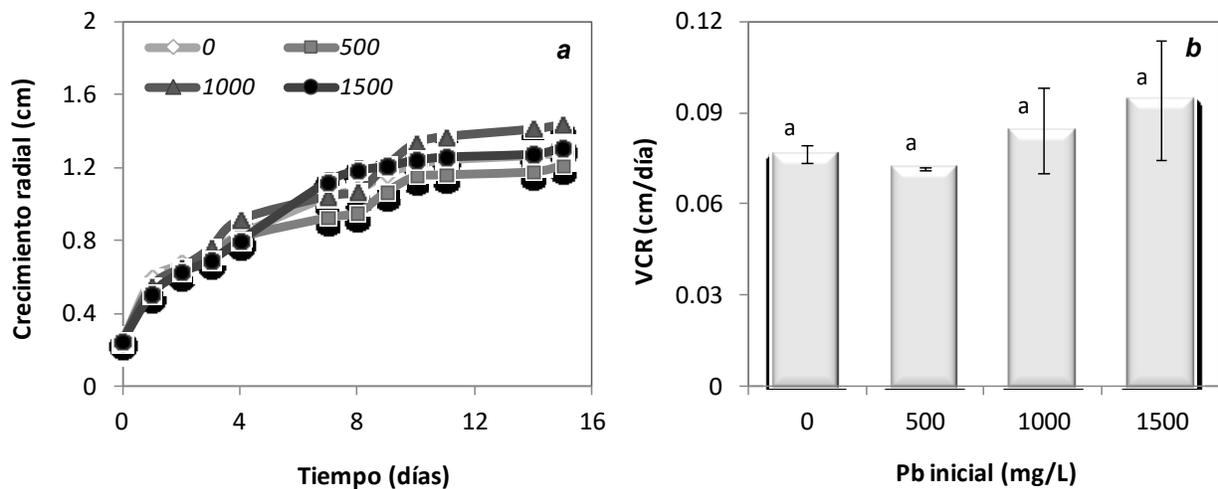


Figura 15. Cinética de crecimiento radial (a) y velocidad de crecimiento radial (VCR) promedio (b) para la cepa AB-2 en función de la concentración inicial de plomo en el medio. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (prueba de Duncan, $\alpha = 0.05$; $n = 3$).

Como puede verse, las cepas FR-1 y PR-1 (Figuras 16 y 17) mostraron una mayor tasa de crecimiento en comparación con las anteriores, lo cual es una característica genotípica específica de cada cepa. En el caso de FR-1, el Pb afectó significativamente la VCR, encontrando un estímulo significativo (casi 27%) con 500 mg Pb/L y una disminución de casi 30 unidades (~30%), con respecto al control, cuando creció con 1500 mg Pb/L (Figura 16).

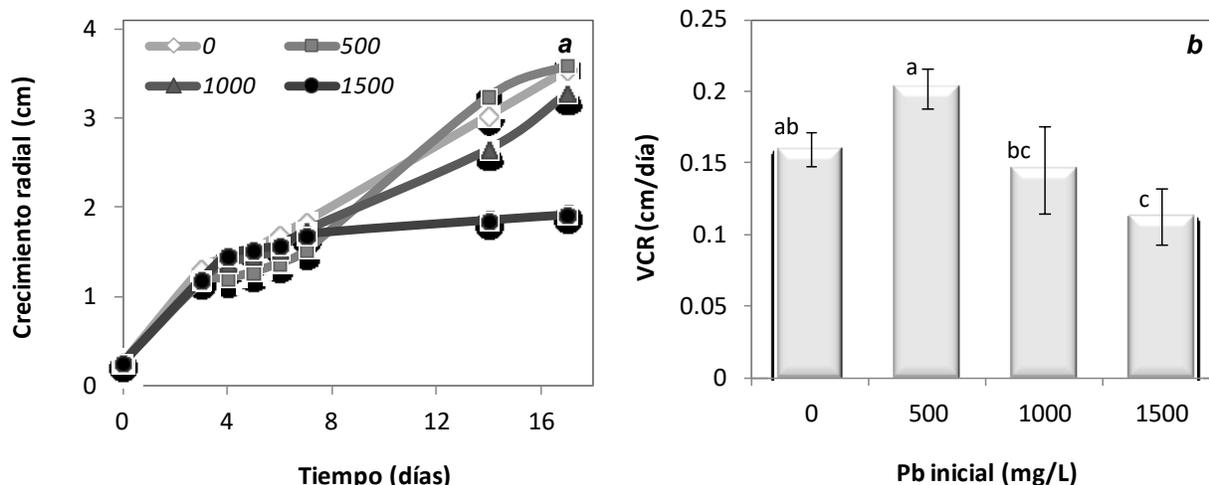


Figura 16. Cinética de crecimiento radial (a) y velocidad de crecimiento radial (VCR) promedio (b) para la cepa FR-1 en función de la concentración inicial de plomo en el medio. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (prueba de Duncan, $\alpha = 0.05$; $n = 3$).

Para PR-1, de forma similar a la cepa AB-2, se registró una disminución significativa en la VCR por efecto del plomo en todas las concentraciones probadas. Pero dicha variable no disminuyó significativamente al aumentar la concentración del metal (Figura 17). Así, nuevamente en este caso, la VCR fue la variable más sensible a la presencia de Pb.

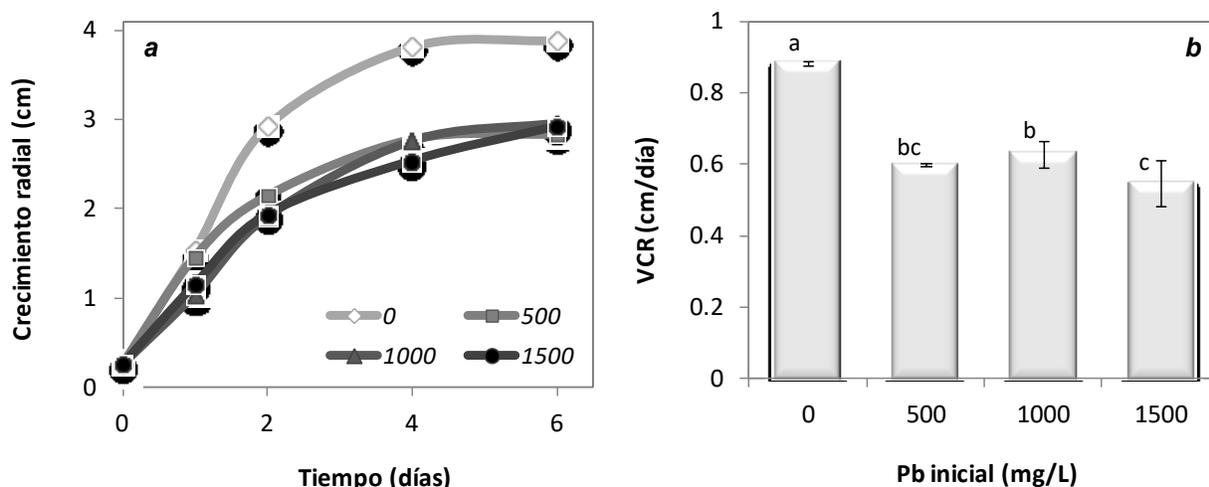


Figura 17. Cinética de crecimiento radial (a) y velocidad de crecimiento radial (VCR) promedio (b) para la cepa PR-1 en función de la concentración inicial de plomo en el medio. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (prueba de Duncan, $\alpha = 0.05$; $n = 3$).

Los resultados obtenidos, en general indican que de las dos variables elegidas para evaluar la tolerancia a plomo por cada una de las cepas, la VCR representa una variable más sensible a la presencia del metal en el medio, por lo que se eligió esta variable para calcular la CI_{50} .

9.4.1.3 Concentración inhibitoria media (CI₅₀)

Con base en los resultados anteriores, se estimó la CI₅₀ para las cepas en estudio, utilizando la VCR como variable de respuesta. En la Tabla 6 se presentan los valores de la CI₅₀ calculados con los datos promedio de la VCR en función de la concentración de Pb.

Tabla 5. Concentración inhibitoria media (CI₅₀)¹ e índices de tolerancia (IT)² obtenidos en función de la concentración de Pb para cada cepa seleccionada.

Cepa	CI ₅₀ (mg Pb/L)	IT (%) ³		
		500 mg Pb/L	1000 mg Pb/L	1500 mg Pb/L
AA-1	1304	107.6 ± 10.9 ^a	68.7 ± 14.4 ^b	43.6 ± 10.6 ^b
DO-S	1500	115.7 ± 14.8 ^{ab}	129.4 ± 16.6 ^a	64.7 ± 10.2 ^c
AB-2	-	93.8 ± 0.7 ^a	109.8 ± 18.4 ^a	123.0 ± 25.4 ^a
FR-1	1580	126.9 ± 8.7 ^a	91.1 ± 19.4 ^{bc}	70.5 ± 12.4 ^c
PR-1	1912	67.9 ± 0.6 ^b	71.3 ± 4.3 ^{ab}	62.1 ± 7.2 ^c

¹ La CI₅₀ se estimó a partir de los datos de la velocidad de crecimiento radial (VCR).

² El valor del IT en los controles sin Pb corresponde a 100%

³ Medias con la misma letra por fila no son significativamente diferentes (Duncan, $\alpha = 0.05$; n = 3).

Puede verse que las cepas más tolerantes fueron AB-2, FR-1 y PR-1, ya que no alcanzaron una CI₅₀ dentro del rango de concentraciones evaluadas en este estudio. Las cepas que mostraron la menor tolerancia a Pb fueron AA-1 y DO-S. Esta respuesta en el caso de DO-S podría atribuirse a que fue aislada a partir de semillas tomadas de arbustos maduros de *D. viscosa* que se encontraban creciendo en los alrededores de un sitio contaminado con residuos mineros, cuya concentración de Pb se encontraba alrededor de 40.1 mg/kg (± 10.2 mg Pb/kg). El resto de los hongos se aisló de raíces de arbustos que contenían concentraciones de Pb superiores a 200 mg/kg MS. Es posible que por tal motivo, la mayor parte de estas cepas sean más tolerantes que la aislada de la semilla de *D. viscosa*. Por ejemplo, el contenido de Pb en las raíces de donde se aislaron las cepas FR-1 y PR-1 era superior a 300 mg/kg MS.

De forma similar a nuestro estudio, Li *et al.* (2011a) probaron la tolerancia a Pb de 64 cepas de hongos endófitos aislados de hojas y tallos de seis plantas dominantes en un sitio contaminado con residuos mineros con Pb (>2600 mg/kg) y Zn (>42000 mg/kg). De éstos, ~50% creció bien (IT > 50%) en presencia de Pb (1200 mg/L), mientras que el resto fue parcial o completamente inhibido cuando crecieron en la misma concentración de Pb, encontrando valores del IT < 40%. Rojas-Loria (2009) también encontró un efecto negativo en la producción de biomasa por el hongo *Lewia* sp., un endófito de *Festuca arundinacea*, por efecto de concentraciones crecientes de plomo soluble (250 y 500 mg Pb/L), con respecto a controles sin plomo; sin embargo, el hongo creció aún en el medio con la mayor concentración de plomo.

El IT es una variable que consiste en determinar la presencia de ciertos contaminantes y adaptaciones que tienen ciertos géneros de hongos para permanecer y crecer en sitios altamente contaminados (Baker, 1987). En nuestro caso, solo la cepa AA-1 alcanzó un IT de 44% cuando creció con una concentración de 1500 mg Pb/L. Para el resto de las cepas crecidas con 1500 mg Pb/L se obtuvo un IT > 60. Las diferencias observadas sobre la producción de biomasa por efecto del plomo entre las cepas en estudio, puede atribuirse a diferencias entre sus mecanismos de tolerancia al metal. Entre éstos, hay mecanismos que reducen la entrada de metales a la célula por quelación extracelular con ligandos excretados y la unión con componentes de la pared celular. Otro mecanismo es la quelación intracelular en el citosol por diversos ligandos como el glutatión y las metalotioneínas, o el aumento en el transporte hacia fuera de las células o hacia compartimentos que no intervienen en las funciones celulares vitales. Otro mecanismo intracelular importante es la capacidad de eliminación de especies reactivas de oxígeno mediante la acción de enzimas o producción de moléculas antioxidantes como el glutatión (Gadd, 1993; Bellion *et al.* 2006).

Los resultados obtenidos indican que algunos hongos que habitan de manera natural dentro de los tejidos de plantas que crecen en sitios contaminados pueden tener una mayor capacidad de adaptación a la presencia de elementos tóxicos, debido a que sus mecanismos de tolerancia deben trabajar de constantemente para mitigar el estrés provocado por la presencia del metal. De hecho, hongos aislados que colonizan tejidos vegetales con diferentes concentraciones de elementos tóxicos, pueden tener diferente tolerancia a dichos elementos (Li *et al.* 2011a). Con base en lo anterior, la inoculación de estas cepas adaptadas al estrés por Pb podría ser benéfica para la fitorremediación de suelos contaminados.

9.4.2 Acumulación de Pb

La biomasa obtenida de las pruebas de tolerancia se utilizó para cuantificar la capacidad de acumulación de Pb por cada cepa (Tabla 6), encontrándose que dicha capacidad dependió de la concentración inicial del metal en el medio. PR-1 fue la cepa que tuvo la menor capacidad para acumular Pb, mientras que en AA-1 se registró la mayor concentración de Pb en biomasa, alcanzando hasta ~10 mg Pb/g MS cuando se cultivó en presencia de 1000 mg Pb/L.

Esta diferentes respuesta en la acumulación de Pb entre las cepas estudiadas, puede atribuirse justamente a diferencias entre sus mecanismos de tolerancia. Los hongos pueden tolerar la presencia de elementos tóxicos debido a la acción de mecanismos activos o pasivos, que evitan el estrés, modifican en su toxicidad y contribuyen a la tolerancia. Entre los principales procesos directamente relacionados con la detoxificación de elementos tóxicos por hongos, se encuentran: intercambio iónico, quelación, adsorción, cristalización, cambio de valencia, precipitación intra- y extracelular y captación activa. De manera general, estos procesos se dividen en mecanismos de

exclusión y mecanismos de inclusión o acumulación (Bellion *et al.* 2006; Göhre y Paszkowski, 2006; Gadd, 2007). Los mecanismos de exclusión evitan o regulan la entrada de elementos tóxicos a la célula, lo cual ocurre a través de: (i) formación de complejos en el medio externo o en la pared celular; (ii) precipitación extracelular en forma de minerales por la excreción de metabolitos como ácidos orgánicos; (iii) inmovilización extracelular por la adsorción en la pared celular por componentes como quitina y melanina; (iv) alteración de transportadores de la membrana que controlan la concentración de los metales en el citosol (Hall, 2002; Bellion *et al.* 2006; Göhre y Paszkowski, 2006; Gadd, 2007). Los mecanismos de acumulación reducen el efecto tóxico de iones metálicos dentro de la célula; éstos se activan cuando los iones llegan a la membrana celular y ocurren por procesos como: (i) secuestro intracelular en compartimentos donde no se afecten procesos vitales; (ii) detoxificación por formación de complejos con moléculas ricas en grupos tiólicos (-SH) como el glutatión; (iii) biotransformación mediante reacciones que modifican la oxidación del metal, disminuyendo su toxicidad (Gadd, 2007; Singh *et al.* 2003; Sharma y Dietz, 2008).

Tabla 6. Capacidad de acumulación de Pb en función de la concentración inicial del metal en el medio por las cepas en estudio.

Pb (mg/L)	Pb en biomasa (mg/kg MS)*				
	AA-1	DO-S	AB-2	FR-1	PR-1
0	13.2 ± 14.7 ^c	11.8 ± 4.4 ^b	4.5 ± 3.1 ^c	20.6 ± 6.3 ^c	2.8 ± 0.9 ^c
500	4331.4 ± 907.4 ^b	244.6 ± 51.6 ^b	158.5 ± 74.9 ^a	170.0 ± 161.0 ^c	50.3 ± 2.2 ^b
1000	10581.0 ± 542.2 ^a	528.3 ± 16.7 ^a	84.0 ± 10.6 ^b	562.0 ± 19.2 ^b	62.6 ± 7.1 ^a
1500	4433.9 ± 911.3 ^b	234.5 ± 52.3 ^b	56.5 ± 2.5 ^{bc}	857.2 ± 27.3 ^a	62.8 ± 2.3 ^a
Pr>F	<0.0001	0.0024	0.0090	<0.0001	<0.0001

* Medias con la misma letra por columna no son significativamente diferentes (Duncan, $\alpha = 0.05$; n = 3). En la última fila se muestra la significancia del ANOVA.

Así, con base en lo anterior, es posible que las cepas más tolerantes (AB-2, FR-1 y PR-1) y que fueron las que acumularon menor cantidad de Pb en su biomasa posean mecanismos de exclusión para tolerar la presencia de altas concentraciones de Pb, mientras que la cepa que presentó mayor acumulación (AA-1), podría presentar cierta tolerancia a la presencia del metal por acción de mecanismos intracelulares. Cabe destacar que esta cepa resultó más sensible con respecto al resto de las cepas aisladas de raíces, probablemente debido a que los efectos tóxicos del metal podrían estar rebasando la capacidad de mecanismos intracelulares de detoxificación. Por las razones anteriores, resulta de gran importancia continuar investigando en este tema, con el fin de aumentar el conocimiento relativo a los mecanismos de tolerancia y exclusión en este tipo de hongos.

9.5 Identificación morfológica de cepas seleccionadas

Las cepas seleccionadas fueron identificadas con base en sus características morfológicas macro- y microscópicas. Para la identificación microscópica, se realizaron microcultivos y se compararon las características microscópicas de cada cepa seleccionada con las reportadas para otros hongos en la bibliografía (Barnett y Hunter, 1998).

La cepa AA-1 (Figura 18) aislada de la raíz de *Acacia* sp. amarilla, presentó colonias blancas aterciopeladas en medio PDA a 30°C las cuales, con el tiempo de incubación, se cubrieron de esporas con aspecto pulverulento de color verde. Entre las características microscópicas, se observaron hifas septadas hialinas y conidias redondas agrupadas en largas cadenas. Con base en sus características macro- y microscópicas, esta cepa puede pertenecer al género *Penicillium*. Existen trabajos (Paknikar *et al.* 1999; Ahluwalia, 2007) que reportan a *P. chrysogenum* como un hongo con alta capacidad para la adsorción de metales como Pb, Zn, Cd, Cr, Cu y Ni. Por su alta capacidad de biosorción, *P. chrysogenum* se considera una especie con potencial para su uso con fines de remediación (Ahluwalia, 2007).

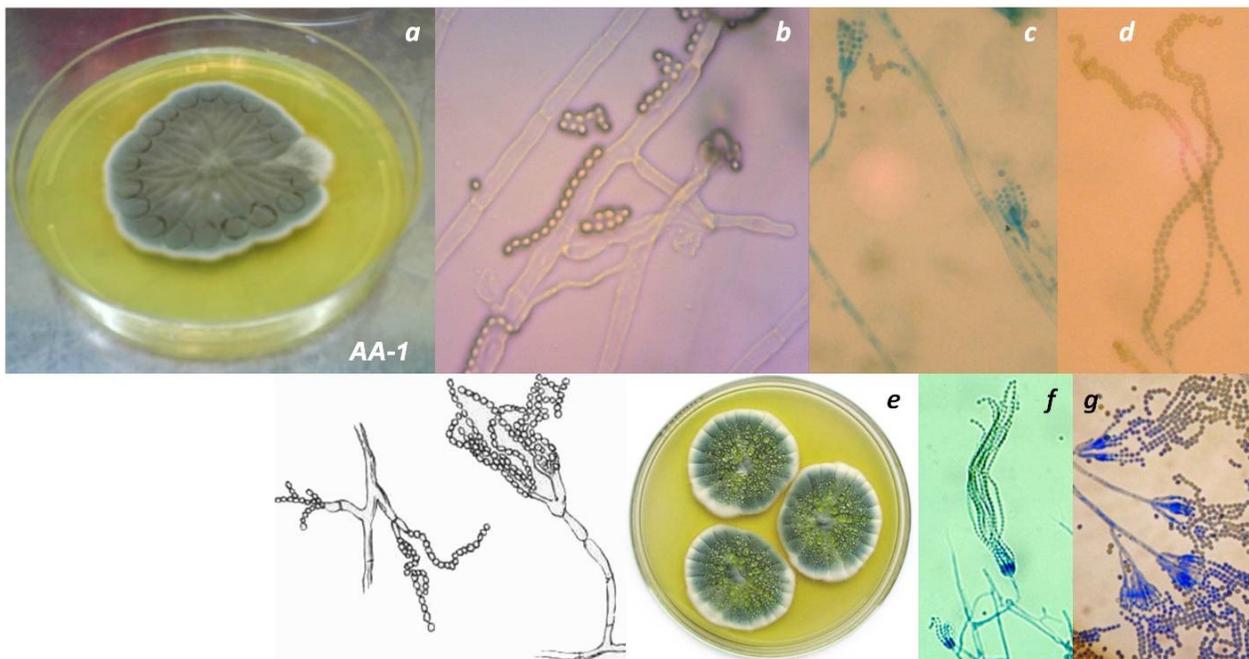


Figura 18. Características morfológicas de la cepa AA-1 (arriba), aislada de raíces de *Acacia* sp. amarilla. Se observa la morfología colonial en medio PDA (a) y la morfología microscópica de hifas (b) y conidias (c, d). En la parte inferior de la Figura, se muestran imágenes de la morfología colonial (e) y microscópica (f, g) de *Penicillium chrysogenum* usadas como referencia para la identificación de la cepa.

La cepa DO-S (Figura 19) aislada de semillas de *D. viscosa* es una cepa de lento crecimiento a 30°C, con colonias de color verde olivo con aspecto rugoso aterciopelado, la parte inferior de la colonia es de color café a marrón oscuro. La cepa presentó las siguientes características microscópicas: hifas septadas oscuras con ramificaciones en donde se observan fiálides con conidias globosas agrupadas en racimos.

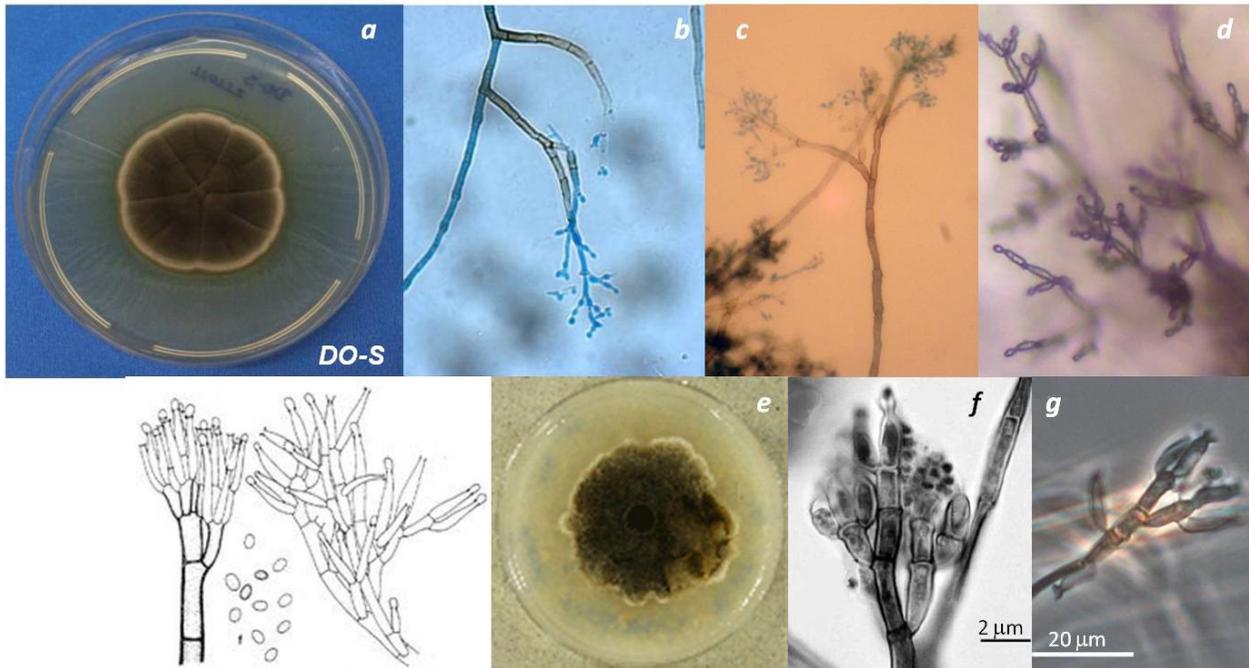


Figura 19. Características morfológicas de la cepa DO-S (arriba), aislada de semillas de *D. viscosa*. Se observa la morfología colonial en medio PDA (**a**) y la morfología microscópica de hifas y estructuras reproductoras (**b**, **c**). En la parte inferior de la Figura se muestra la morfología colonial de *Phialocephala* sp. (**e**) y la morfología microscópica de *P. urceolata* (**f**) y *P. fortinii* (**g**), usadas como referencia para la identificación de la cepa.

Esta cepa muestra características muy parecidas al género *Phialocephala*. Wang et al., (2009) describieron a *P. urceolata*, una especie estrechamente relacionada con otras especies de *Phialocephala* reconocidas como hongos endófitos septados oscuros (DSE, por sus siglas en inglés) de raíces de plantas vasculares (*P. fortinii* y *P. sphaeroides*) y como hongos que se asocian con órganos como tallos y hojas de plantas leñosas (*P. compacta* y *P. dimorphospora*). De forma similar a la cepa DO-S, *P. urceolata* presenta una lenta tasa de crecimiento y produce halos con coloración roja o café que se atribuyen a la producción de polifenol oxidasa. El hecho de que esta cepa se aisló de semillas de *D. viscosa* desinfectadas de acuerdo al protocolo descrito (Sección 6.4.1), indica que se trata de un hongo endófito de dicha planta. A la fecha, aún se conoce poco acerca de los hongos DSE, pero varios estudios han demostrado su impacto positivo en el crecimiento y supervivencia de las plantas hospederas. Además, su prevalencia en

hábitats extremos (Likar y Regvar, 2009). De hecho, en el presente estudio se demostró el efecto benéfico de esta cepa sobre el crecimiento de *D. viscosa*. Los DSE pertenecen a la división *Ascomycota*, son hongos anamórficos que se caracterizan por colonizar tejidos de raíces intra- e intercelularmente. Pueden establecer asociaciones con plantas, que van desde el parasitismo al mutualismo y mejoran la captación de nutrientes como P y N (Jumpponen, 2008).

A la fecha, hay estudios que demuestran la aplicación de algunos géneros de DSE para la remediación de sitios contaminados. Por ejemplo, Li *et al.* (2011b) inocularon el DSE *Exophiala pisciphila* en raíces de maíz (*Zea mays* L.), encontrando que el hongo colonizó las raíces y formó estructuras típicas de este tipo de hongos. La colonización por *E. pisciphila* mejoró la tolerancia de la planta a altas concentraciones de metales (Pb, Zn y Cd) por la restricción de su translocación a la parte aérea y promovió el crecimiento de raíces y tallos. Likar y Regvar (2009) estudiaron las comunidades de hongos endófitos en raíces de *Salix caprea* en un sitio contaminado con metales. Este grupo encontró una gran diversidad de DSE, principalmente de los géneros *Phialophora*, *Phialocephala* y *Leptodontidium*, en las ubicaciones con mayor concentración de metales, por lo que se sugiere que este grupo de hongos mejora la tolerancia a altas concentraciones de metales en *S. caprea*.

La cepa AB-2 (Figura 20), aislada de raíces de *Acacia* sp. blanca, es una cepa de crecimiento rápido a 30°C, con colonias de textura aterciopelada inicialmente blancas que se tornan de color café-grisáceo con el tiempo, posteriormente adquiere una coloración más oscura con orilla de color gris claro. Como parte de las características microscópicas, la cepa presenta hifas septadas oscuras de color café oscuro y conidias grandes con cuatro tabiques, ovaladas con puntas redondeadas y color marrón.

Con base en las observaciones macro- y microscópicas, es probable que la cepa AB-2 pertenezca al género *Bipolaris*. Este género produce grandes conidias multicelulares de color oscuro, producidas a través de poros en la pared de los conidióforos (poroconidias). Éstas solo germinan por los polos (bipolar) y pueden tener forma fusoide a cilíndrica, con ambos extremos redondeados (Ulloa y Herrera, 1994). El género *Bipolaris* contiene alrededor de 45 especies, de las cuales, muchas son parásitos de plantas tropicales y sub-tropicales. Asimismo, se reporta que algunas especies tienen cierto nivel de fitopatogenicidad para gramíneas (Winder y Van Dike, 1990). También se han reportado que especies como *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* y *B. specifera* son patógenas para humanos³. Debido al parecido de la cepa AB-2 con *B. australiensis* y/o *B. specifera* y, dado que ambas especies son patógenas, esta cepa será descartada para estudios posteriores hasta confirmar su especie por técnicas moleculares.

³ [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(dematiaceous\)/Bipolaris/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(dematiaceous)/Bipolaris/).

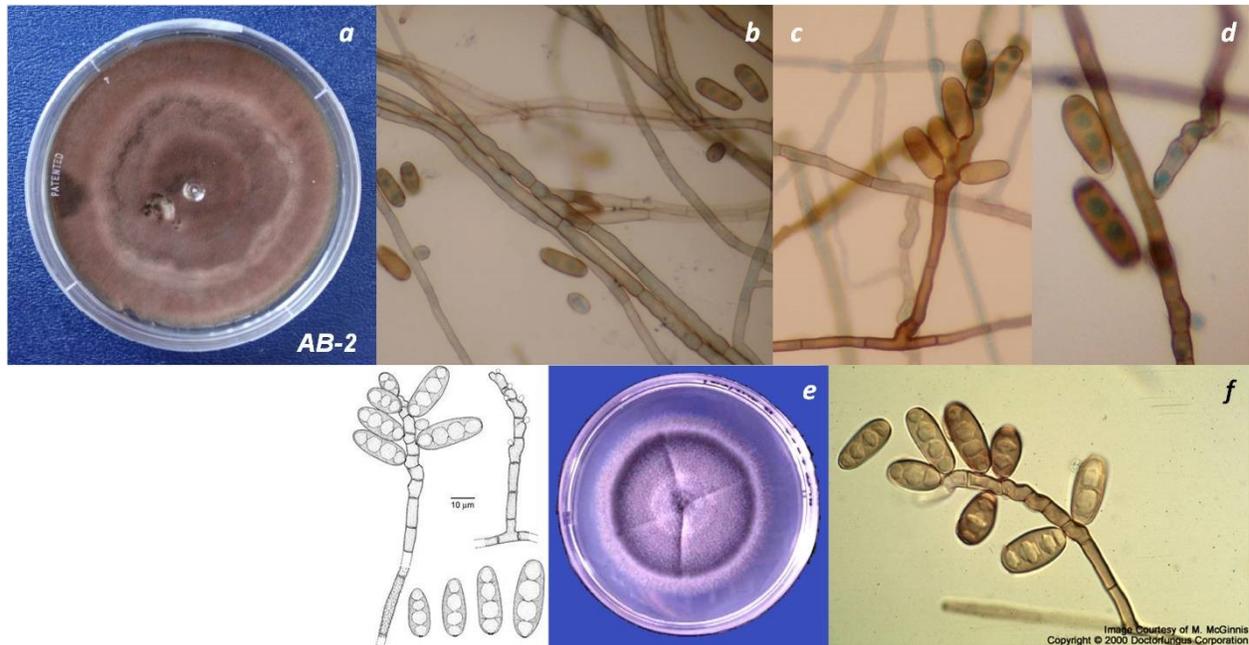


Figura 20. Características morfológicas de la cepa AB-2 (arriba), aislada de raíces de *Acacia* sp. blanca. Se observa la morfología colonial en medio PDA (**a**) y la morfología microscópica de hifas (**b**) y macroconidias (**c**, **d**). En la parte inferior de la Figura se muestran imágenes de la morfología colonial y microscópica (**e**, **f**) de *Bipolaris australiensis* usadas como referencia para la identificación de la cepa.

La cepa FR-1 (Figura 21), aislada de raíces de *Fraxinus* sp., es una cepa de crecimiento relativamente lento en PDA a 30°C, con colonias de textura aterciopelada con una tonalidad inicialmente amarilla que progresivamente se torna verdosa y de aspecto arenoso. Entre las características microscópicas, la cepa presenta hifas septadas hialinas y estructuras reproductoras asexuales típicas del género *Aspergillus*, con fiálides y conidióforos monoverticiliados. Después de ~10 días de incubación, el hongo forma estructuras reproductoras sexuales, observándose la presencia de cleistotecios, células “hülle” y ascosporas, características del género *Emericella*.

El género *Emericella* que pertenece a la división *Ascomycota*, es la forma sexual o teleomorfo de *Aspergillus*. Este género produce ascosporas en un cleistotecio, que es un cuerpo fructífero (ascoma) completamente cerrado, generalmente esférico o globoso que varía en color y textura. Macroscópicamente, las colonias generalmente tienen textura aterciopelada y su color puede variar e incluir verde, amarillo, gris y beige. *Emericella* es un género muy común en regiones tropicales y subtropicales, y comúnmente puede aislarse del suelo, plantas, material vegetal y algunos alimentos⁴. Por ejemplo, Jiang *et al.* (2008) evaluaron el efecto de hongos asociados con *Acacia auriculaeformis* (*Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp.) sobre el crecimiento de *Brassica juncea* en un suelo contaminado con Cd y Ni. Este grupo encontró que el crecimiento de plantas

⁴ <http://microfungi.truman.edu/index.php>

inoculadas con *Aspergillus* mejoró con respecto a plantas sin inocular y que la inoculación mejoró los factores de translocación y bioacumulación de metales. De hecho, se ha demostrado que hongos de los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus* tienen potencial para mejorar la fitorremediación de suelos contaminados con metales (Deng *et al.* 2011).

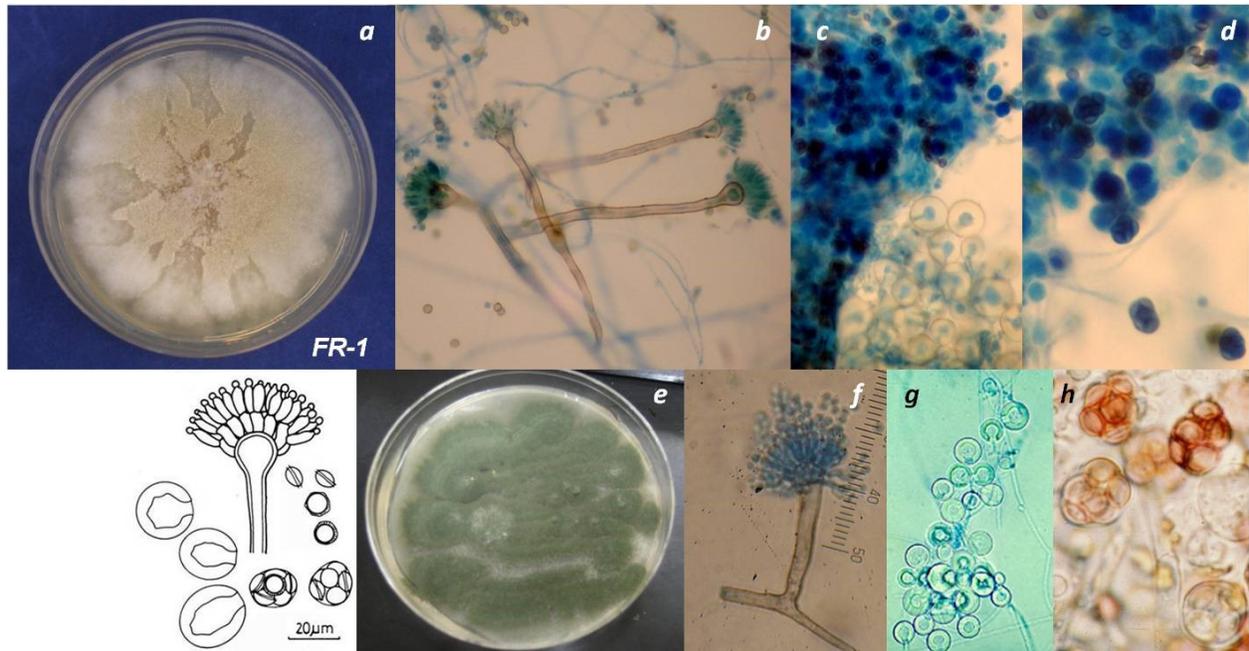


Figura 21. Características morfológicas de la cepa FR-1 (arriba), aislada de raíces de *Fraxinus* sp. Morfología colonial en medio PDA (a), morfología microscópica de conidióforos (b), cleistotecio y células “hülle” (c) y ascosporas (d), características del género *Emericella*. En la parte inferior se muestran las imágenes de referencia para la identificación: morfología colonial (e), conidióforo (f), células “hülle” (g) y ascosporas (h) de *Emericella* sp.

La cepa PR-1 (Figura 22), aislada de raíces de *Prosopis* sp., es una cepa de crecimiento muy rápido a 30°C en medio PDA, que produce colonias blancas de aspecto algodonoso con abundante crecimiento aéreo. En cuanto a sus características microscópicas, se observaron hifas hialinas cenocíticas con vesículas que con el tiempo de incubación se cubrieron de esporangiolos esféricos. En cultivos de aproximadamente 12 días se observaron rizoides.

Las características morfológicas macro- y microscópicas observadas en PR-1, sugieren que puede tratarse del género *Cunninghamella*, un hongo filamentoso de la división *Zygomycota*. Este género se caracteriza por la formación de colonias algodonosas blancas a grises de rápido crecimiento⁵. Tiene hifas gruesas sin septos (cenocíticas) o escasamente septadas, los esporangióforos son largos y terminan en vesículas globosas o esféricas con dentículos, cuya superficie

⁵ http://labmed.ucsf.edu/education/residency/fung_morph/fungal_site/zygompage.html

se cubre completamente con esporangiolos redondos u ovalados que contienen una sola espora con paredes suaves o ligeramente equinuladas. Pueden también encontrarse presentes zigosporas y rizoides⁶. Las especies de *Cunninghamella* habitan suelos principalmente en regiones subtropicales y mediterráneas. El género contiene siete especies conocidas, de las cuales *C. bertholletiae* es la única conocida como patógena de animales y humanos⁷.

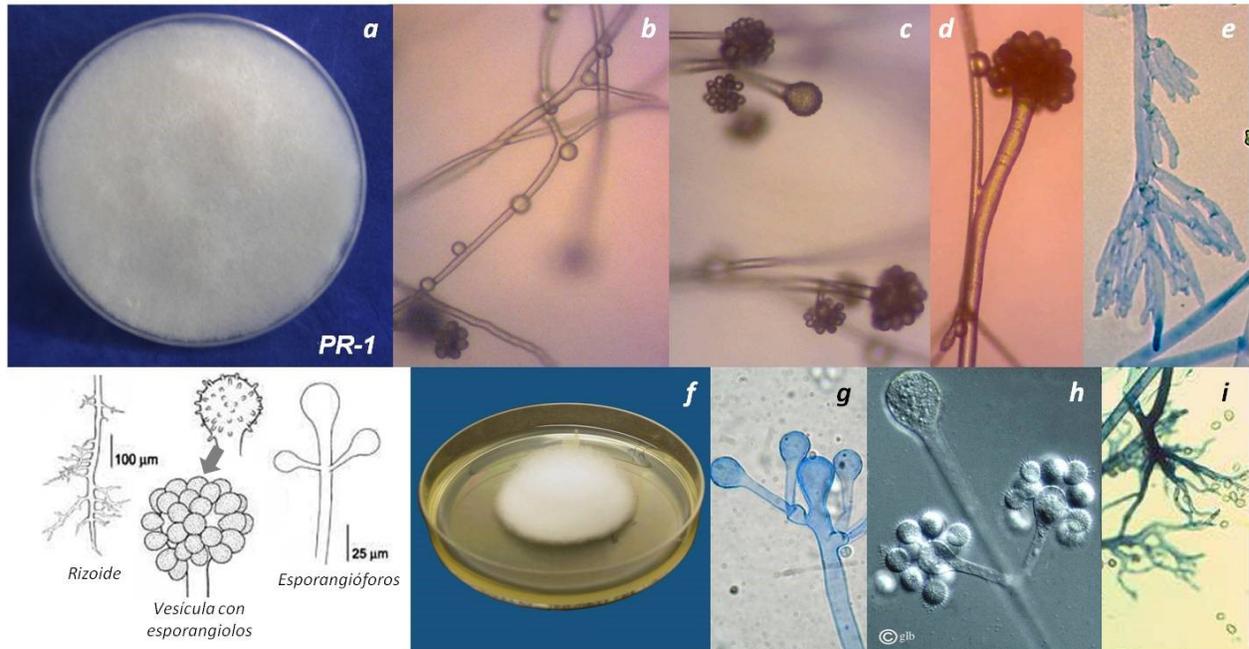


Figura 22. Características morfológicas de la cepa PR-1 (arriba), aislada de raíces de *Prosopis* sp. Morfología colonial en medio PDA a los 5 días de incubación a 30°C (**a**); hifas cenocíticas con vesículas en un cultivo de 24 h (**b**); esporangióforos en un cultivo de 48 h (**c**, **d**); rizoide en un cultivo de 12 días (**e**). En la parte inferior se muestran las imágenes de referencia para la identificación: colonia de *Cunninghamella* sp. (48 h) (**f**), vesículas (**g**), esporangióforos con esporangiolos (**h**) y rizoide (**i**) de *Rhizopus* sp.

A la fecha, existen muy pocos reportes de este género como endófito de plantas. Sin embargo, Fang *et al.* (2009) aislaron una cepa del género *Cunninghamella*, endófito de *Atractylodes lancea*. Deng *et al.* (2011) aislaron un hongo endófito de raíces de *Brassica chinensis* del género *Mucor*, un zigomiceto, al igual que *Cunninghamella*. Esta cepa de *Mucor* sp. fue tolerante a Pb y Cd y presentó una máxima capacidad de biosorción de ~88 mg Pb/g MS y ~55 mg Cd/g MS, por lo que se concluye que podría usarse para descontaminar medios que contienen dichos metales. De Oliveira-Franco *et al.* (2004) encontraron una alta capacidad de biosorción de metales como Cu, Pb y Fe presentes en aguas residuales por biomasa de *C. elegans*. Méndez de Souza *et al.*,

⁶ <http://zygomycetes.org/>

⁷ <http://www.doctorfungus.org/thefungi/>

(2005) también reportan que cepas de *C. elegans* aisladas de sedimentos de manglar mostraron una alta capacidad de biosorción de Cu mediante la precipitación intracelular por polifosfatos.

En los últimos años, las interacciones entre metales, microorganismos y plantas han llamado la atención debido al potencial biotecnológico de los microorganismos para remover metales directamente de medios contaminados y a su posible acción sobre la mejora del crecimiento de plantas en sitios contaminados. Como los microorganismos endófitos de plantas que acumulan metales pueden soportar altas concentraciones de ciertos elementos tóxicos, las plantas que crecen en sitios contaminados con metales pueden albergar varios tipos de hongos endófitos con potencial para biorremediación. No obstante, tales potenciales aún no han sido bien explorados con fines de fitorremediación, pero está demostrado que los hongos poseen una gran capacidad para inmovilizar metales tóxicos a través de: (i) la formación de oxalatos metálicos insolubles; (ii) la biosorción o la quelación en polímeros tipo melanina (Deng *et al.* 2011).

Así, el uso de hongos que pueden asociarse con plantas fitorremediadoras, además de mejorar el crecimiento vegetal, puede tener una serie de ventajas para las mismas, principalmente a través de la reducción del estrés que causa la presencia de elementos tóxicos en el suelo. Con base en lo anterior, es de gran importancia continuar el aislamiento y el estudio de este tipo de hongos con fines de fitorremediación.

10 CONCLUSIONES

- Se aislaron 52 cepas de hongos endófitos a partir de raíces de arbustos de los géneros *Acacia*, *Prosopis*, *Fraxinus* que crecían en un sitio contaminado con plomo, además de un hongo endófito septado oscuro a partir de semillas de *Dodonaea viscosa*.
- De los 53 aislados, se seleccionaron cinco cepas que interaccionaron con *D. viscosa* bajo condiciones *in vitro*, encontrando que dos de ellas (AA-1 y DO-S) estimularon significativamente (>100%) la producción de biomasa de raíces y tallos de la planta.
- En general, las cepas aisladas de raíces que contenían plomo resultaron más tolerantes al metal que la cepa aislada de semillas de *D. viscosa* (DO-S). La tolerancia, evaluada como la CI_{50} en el rango de concentraciones estudiado (0-1500 mg Pb/L), se encontró en el siguiente orden para las cepas seleccionadas: AB-2 > PR-1 > FR-1 > DO-S > AA-1.
- Con base en las características morfológicas de las cepas seleccionadas, se sugiere que AB-2 pertenece al género *Bipolaris*, PR-1 a *Cunninghamella*, FR-1 a *Emericella*, DO-S a *Phialocephala* y AA-1 al género *Penicillium*.
- Una vez que se demuestre la no patogenicidad de las cepas aisladas y de más estudios sobre su tolerancia a metales tóxicos, AB-2, FR-1 y PR-1 podrían aplicarse para estudios de fitorremediación, debido a su tolerancia a concentraciones elevadas de plomo.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abello F.J., Kelemu S. 2006. Hongos endófitos, ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 7(2): 55-57.
- Adams P., De Leij F.A.A.M., Linch J.M. 2007. *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal- contaminated soil. *Microbial Ecology*. 54:306-313.
- Ahluwalia S.S., Goyal D. 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*, 98: 2243-2257.
- 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 Charest C. 2007. Heavy metal phytoremediation from a meta-analytical perspective. *Environmental Pollution*, 147: 231-237.
- Bacon CW, Porter JK, Robbins JD y Luttrell ES. 1977. *Epichloe typhina* from toxic tall fescue grasses. *Applied and Environmental Microbiology*. 34:76–81.
- Baker A.J.M. 1987. Metal tolerance. *New Phytologist*, 106(s1): 93-111.
- Barea J.M., Azcón-Aguilar C. Y Roldan-Fajardo B. 1984. Avances recientes en el estudio de la micorriza VA. Formación, funcionamiento y efectos recientes en nutrición vegetal. *Anales de Edafología y Agrobiología*. Granada, España. 659-677.
- Barkay T., Schaefer J. 2001. Metal and radionucleotide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Current Opinion in Microbiology*, 4: 318 – 323 pp.
- Barnett H.L., Hunter B. B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. *The American Phytopathological Society*, 4^a Ed., St. Paul, Minnesota, 218 pp.
- Bellion M., Courbout M., Jacob C., Blaudez D., Chalot M. 2006. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 254: 173-181.
- Brunet J, Repellin A, Varrault G, Terrync N, y Zuily-fodil. 2008. Lead accumulation in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus*): A novel plant for phytoremediation systems? *Comptes Rendus Biologies*, 331: 859-864
- Buchanan B.B., Groissem W., Jones R.L. 2000. Biochemistry and molecular biology of plants. *American Society of Plant Physiologists*, Rockville, M. D.
- Camacho F., González V., Olivera A. 1992. Germinación y Manejo en vivero del Chapulixtle (*Dodonaea Viscosa* (L.) Jacq.). Memorias de la Reunión Científica Forestal y Agropecuaria. Centro de Investigación de la Región del Centro, Campo Experimental Coyoacán, Mexico, D.F.

- Carpena R.O., Bernal M.P. 2007. Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Ecosistemas*, 16 (2): 1-3.
- Cao L., Jiang M., Zeng Z., Du A., Tan H., Liu Y. 2008. *Trichoderma atroviride* F6 improves phytoextraction efficiency of mustard (*Brassica juncea* (L.) Coss. var. *foliosa* Bailey) in Cd, Ni contaminated soils. *Chemosphere*, 71: 1769–1773.
- Clay K. 1998. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*. 69: 10-16.
- Cruz-Hernández A. 2008. Remoción de hidrocarburos por la interacción planta-hongo filamentoso bajo condiciones *in vitro*. Tesis de Maestría, Posgrado en Biotecnología. *Universidad Autónoma Metropolitana*. 41 pp.
- Csuros M., Csuros C. 2002. Environmental sampling and analysis for metals. *Lewis Publishers*. 226-332 pp.
- Debarati P., Pandey G., Pandey J., Jain R.K. 2005. Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. *Trends in Biotechnology*, 23: 135-142.
- Deng Z., Cao L., Huang H., Jiang X., Wang W., Shi Y., Zhang R. 2011. Characterization of Cd and Pb resistant fungal endophyte *Mucor* sp. CBRF59 isolated from rapes (*Brassica chinensis*) in a metal contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 185: 717-724.
- Díaz-Puentes L.N. 2009. Molecular interactions between plants and microorganisms: saponins as plant chemical defenses and their microbial tolerance. *Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2): 32-55
- Diederichs C y Moawad A. M. 1993. The potential of VA micorrhizae for plant nutrition in the tropics. *Angewandte Botanik*. 67:91-96.
- Doty S.L. 2008. Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytologist*, 179: 318–333.
- Dushenkov S. 2003. Trends in phytoremediation of radionuclides. *Plant and Soil*, 249: 167-175
- Eapen S., Susselan K. N., Tivarekar S., Kotwal S. A. y Mitra R. 2003. Potential for rhizofiltration of uranium using hairy roots of *Brassica juncea* and *Chenopodium amaranticolor*. *Environmental Research*, 91(2): 127-133.
- Fang F., Dai C.C., Wang Y. 2009. Role of nitric oxide and hydrogen peroxide in the essential oil increasing of suspension cells from *Atractylodes lancea* induced by endophytic fungal *Cunninghamella* sp. AL4 elicitor. *Chinese Journal of Biotechnology*, 25: 1490-1496.
- Flathman P.E., Jerger D.E., Exner J.H. 1994. Bioremediation Field Experiences. *CRC Press*, Boca Raton, Florida, p.p. 450-548.
- Fuentes-Dávila G., Ferrera-Cerrato R. 2007. Ecología de la raíz. *Sociedad Mexicana de Fitopatología*, A.C. 1-26.

- Gadd G.M. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, 124: 25-60.
- Gadd G.M. 2004. Mycotransformation of organic and inorganic substrates. *Mycologia*, 18: 60-70.
- Gadd G.M. 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*, 111: 3-49.
- Gamboa-Gaitán M.A. 2006. Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas, *Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia*. Bogotá, Colombia, AA 14490: 1-5.
- Göhre V., Paszkowski U. 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta*, 223:1115–1122.
- Gocht W.R., Zantop H., Eggert R.G. 1988. International Mineral Economics. *Springer – Verlag*, Berlin, 271 pp.
- Gutiérrez Rojas M., Volke Sepúlveda T.L., Ramírez Islas M.E., Gómez Santos A. 2009. Selección de plantas del estado de Guanajuato con capacidad para fitorremediar suelos contaminados con metales. *Informe Final*. Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica, CONACYT-Gobierno del Estado de Guanajuato. 59 pp.
- Gutiérrez, M.E. y M. Moreno. 1997. Los residuos en la minería mexicana. INE, México. Disponible en Internet en: http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/35/los_residuos.html?id_pub=35
- Hall J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1-11.
- Hilderbrandt U., Kaldorf M., Bothe H. 1999. The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology*, 154: 709 – 717.
- Jian W., Chen J., William R., Cunningham R. 1997. Phytoremediation of lead-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environmental Science and Technology*, 31: 800-805.
- Jiang M., Cao L., Zhang R. 2008. Effects of Acacia (*Acacia auriculaeformis* A. Cunn) associated fungi on mustard (*Brassica juncea* (L.) Coss. var. *foliosa* Bailey) growth in Cd and Ni contaminated soils. *Letters in Applied Microbiology*, 47: 561–565.
- Johnson M.C., Dahlman D.L., Siegel M.R., Bush L.P., Latch G.C., Potter D.A., Varney D.R. 1985. Insect feeding deterrents in endophyte-infected tall fescue. *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 568-571.
- Jumpponen A., Johnson L. C. 2008. Can rDNA analyses of diverse fungal communities in soil and roots detect effects of environmental manipulations - a case study from tallgrass prairie. *Mycologia*, 97(6): 1177-1194.
- Kavamura V.N., Esposito E. 2010. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology Advances*, 28: 61-69.

- 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.
- Kidd P., Barceló J., Pilar-Bernal M., Navari-Izzo F., Poschenrieder Ch., Shilev S., Clemente R., Monterroso C. 2009. Trace element behaviour at the root-soil interface: implications in phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany*, 67: 243-259.
- Knoch T., Faeth S., Arnott D. 1993. Endophytic fungi alter foraging and dispersal by desert seed-harvesting ants. *Oecologia*, 95: 470-473.
- Krämer U. 2005. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion in Biotechnology*, 16: 133-141.
- Kuiper I, Lagendijk L.E, Bloemberg G.V and Lugtenberg. B.J.J. 2004. Rizoremediation: A beneficial plant – microbe interaction. *The American Phytopathological society*. 17(1): 6-15.
- Larone D.H. 1993. Medically Important fungi a guide to identification, 2a Ed. *American Society for Microbiology*, Washington, DC, USA, pp. 210.
- Lebeau, T; Braud, A; Jezequel, K; AF Lebeau, Thierry; Braud, Armelle; Jezequel, Karine. 2008. Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. *ENVIRONMENTAL POLLUTION*. 153(3):497-522.
- Ledin M. 2000. Accumulation of metals by microorganisms-processes and Importance for soil systems. *Earth-Science Reviews*, 51: 1–31.
- Li H.Y., Li D.W., He C.M., Zhou Z.P., Mei T., Xu H.M. 2011a. Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb-Zn mine wasteland in China. *Fungal Ecology*, doi:10.1016/j.funeco.2011.06.002.
- Li T., Liu M.J., Zhang X.T., Zhang H.B., Sha T., Zhao Z. W. 2011b. Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. *Science of the Total Environment*, 409: 1069-1074.
- Likar M., Regvar M. 2009. Application of temporal temperature gradient gel electrophoresis for characterization of fungal endophyte communities of *Salix caprea* L. in a heavy metal polluted soil. *Science of the Total Environment*, 407: 6179–6187.
- López-Millan A. F., Ellis D. R., Grusak M. A. 2004. Identification and characterization of several new members of the ZIP family of metal ion transporters in *Medicago truncatula*. *Plant Molecular Biology*, 54: 583-596.
- Lucero M.E., Barrow J.R., Osuna P., Reyes I. 2006. Plant–fungal interactions in arid and semi-arid ecosystems: Large-scale impacts from microscale processes. *Journal of Arid Environmental*, 65: 276–284.
- Méndez de Souza P., Marinho P.H., Lima M.A. 2005. Copper influence on polyphosphate metabolism of *Cunninghamella elegans*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36: 315-320

- Müller C.B., Krauss J. 2005. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 450-456.
- Naumann, B., Busch, A., Allmer, J., Ostendorf, E., Zeller, M., Kirchhoff, H. and Hippler, M. (2007) Comparative quantitative proteomics to investigate the remodeling of bioenergetic pathways under iron deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proteomics*, 7:3964-3979.
- Navarro-Aviñó, J.P., Aguilar-Alonso I., López-Moya J.R. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16 (2): 10-25.
- Núñez L., Meas Y., Ortega B., Olguin J. 2004. Fitorremediación fundamentos y aplicaciones. *Ciencia*, 69-82.
- NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo (VI), mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio. Diario Oficial de la Federación (DOF), Vol. 642 (2) (2 de marzo de 2007), 35-96.
- Oliveira-Franco L., de Cássia M.R., Porto A.L., Sacconi-Messias A., Fukushima K., de Campos-Takaki. 2004. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 243-247.
- Paknikar K.M., Puranik P.R., Pethkar A.V. 1999. Development of microbial biosorbents—A need for standardization of experimental protocols. En: Amils R., Ballester A. (eds), *Biohydrometallurgy and the Environment Toward the Mining of the 21st Century, Part B, Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS '99*, San Lorenzo del Escorial, Spain, June 20–23 1999, Elsevier, Amsterdam. 363–372.
- Pilon-Smits E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 15-39.
- Porrás-Alfaro A., Bayman P. 2011. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, 49: 291–315.
- Rivera-Becerril F. 2006. Tolerancia de la micorriza arbuscular contra los metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48 (2): 158 – 160.
- Rojas-Loria C.C. 2010. Efecto de la interacción hongo-*Dodonea viscosa* L. Jacq en la fitorremediación de plomo en un sistema *in vitro*. *Tesis de Maestría*, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F.
- Sharma S.S. and Dietz K.J. 2008. The relationship between metal toxicity and cellular redox. *Biochemistry and Physiology of plants*. 14(1): 43-50
- Sellers K. 1999. Fundamentals of hazardous waste site remediation. *Lewis Publishers*, 326 pp.
- SEMARNAT 2004b. Información proporcionada por la dirección general de gestión integral de materiales y actividades riesgosas. INE, Mexico. Disponible en INE <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/459/cap2.html>.
- Smith, S.E. 1980. Mycorrhizas of autotrophic higher plants. *Biology*. 55: 475-510.

- Sieber B. 2007. Endophytic fungi of forest trees: are they mutualist? *Fungal Biology Reviews*, 21:75-89.
- Singh H.P., Batish D.R., Kohli R.K. 2003. Allelopathic interactions and allelochemicals: New possibilities for sustainable weed management. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22: 239–311.
- Smith R.A.H., Bradshaw A.D. 1970. Reclamation of toxic metalliferous wastes using tolerant populations of grass. *Nature*, 227: 376-377
- Stomp A.M., Han K.H., Wilbert S., Gordon M., Cunningham S.D. 1994. Genetic strategies for enhancing phytoremediation. Recombinant DNA Technology II. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 721: 481-491.
- Ulloa M., Herrera T. 1994. Etimología e Iconografía de géneros de hongos. *Cuadernos del Instituto de Biología*. Universidad Nacional Autónoma de México. Vol. 21, 300 pp.
- Vangronsveld, J. 1998. Case studies in the field – Industrial sites: *Phytostabilization of zinc-smelter contaminated site*: The Lommel-Maatheid case. pp. 211-216. In: Vangronsveld, J. and S.D. Cunningham (eds.). *Metal-contaminated soils: In situ inactivation and phytoremediation*. R.G. Landes Company. Georgetown, TX.
- Van Deuren J., Wang Z., Ledbetter J. 1997. Remediation technologies screening matrix and reference Guide. 3^a Ed. Technology innovation office, EPA <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.
- Volke Sepúlveda T.L., Velasco J.A., de la Rosa D.A. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. *Instituto Nacional de Ecología - Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (INE-SEMARNAT)*. ISBN: 968-817-492-0. 141 pp.
- Wang W., McGhee D., Gibas C., Tsuneda A., Currah R. 2009. *Phialocephala urceolata*, sp. nov., from a commercial, water-soluble heparin solution. *Mycologia*, 101: 136-141.
- Winder S.R., Van Dyke C.G. 1990. The pathogenicity, virulence, and biocontrol potential of two *Bipolaris* species on Johnson grass (*Sorghum halepense*). *Weed Science*, 38: 89-94.
- Zhuang X., Chen J., Shim H., Bai Z. 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environmental international*. 33:406-413.