



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

“Influencia de un hongo endófito tratado electroquímicamente sobre el crecimiento de *Dodonaea viscosa* y su tolerancia al plomo”

Tesis para obtener el grado de:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

Biol. Mauricio Rueda González

Matricula: 2223801814

Correo electrónico: incursio961028@gmail.com

Comité tutorial:

Directora
Asesora
Asesor

Dra. Nancy Velasco Alvarez
Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda
Dr. Cesar Cuahutémoc Rojas Loria

Jurado:

Presidente
Secretaria
Vocal
Vocal

Dr. Octavio Loera Corral
Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda
Dra. María Aurora Martínez Trujillo
Dr. Cesar Cuahutémoc Rojas Loria

Iztapalapa, Ciudad de México a 23 de septiembre del 2025.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa por permitirme llevar a cabo este proyecto en sus instalaciones.

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

A mi directora la Dra. Nancy Velasco Alvarez por su apoyo incondicional y su inagotable paciencia, sin los cuales no habría podido culminar este trabajo.

A la Dra. Tania Volke Sepúlveda por darme la oportunidad de ser parte de este grupo de trabajo y por sus valiosos comentarios a lo largo de este trabajo.

Al Dr. Cesar Cuahutémoc Rojas Loria por brindarme su apoyo durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Octavio Loera Corral y la Dra. María Aurora Martínez Trujillo por sus acertados comentarios en la revisión de esta Tesis.

Dedicatorias

A mi mamá Angela, por siempre creer en mí y ser la inspiración que me motiva a seguir avanzando.

A mi compañera de vida Pamela, que me ha acompañado y apoyado incondicionalmente durante todo este proceso.

A mis hermanos Sofia y Raúl, que siempre me han apoyado y motivado a alcanzar mis metas.

A Ignacio, quien es como mi padre y ha sido un ejemplo a seguir.

A las Dras. Nancy y Tania, quienes considero mis mentoras y estimo mucho

A mis compañeros de laboratorio, que me brindaron compañía y consejos.

Contenido

INTRODUCCIÓN	1
1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1. CONTAMINACIÓN DE SUELO POR METALES PESADOS (MP).....	3
1.2. EFECTO DEL PLOMO (Pb) EN LOS ORGANISMOS.....	4
1.3. REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON MP	6
1.3.1 <i>Tratamientos fisicoquímicos</i>	6
1.3.2 <i>Tratamientos biológicos</i>	7
1.4. MECANISMOS DE TOLERANCIA DE LAS PLANTAS A LOS MP	10
1.5. <i>DODONAEA VISCOSA</i>	12
1.6. HONGOS ENDÓFITOS SEPTADOS OSCUROS (DSE)	13
1.7. PREPARACIÓN CONTRA ESTRÉS “PRIMING”.....	14
1.7.1 <i>Corriente eléctrica para inducir estrés como estímulo</i>	15
2 JUSTIFICACIÓN	16
3 HIPÓTESIS	17
4 OBJETIVOS.....	18
4.1. OBJETIVO GENERAL	18
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
5.1. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
5.2. MATERIAL BIOLÓGICO.....	20
5.2.1 <i>Microorganismos y medio de cultivo</i>	20
5.2.2 <i>Plantas de Dodonaea viscosa</i>	20
5.3. PRUEBAS DE TOLERANCIA AL Pb: ASOCIACIÓN <i>D. VISCOSA</i> CON <i>CLADOSPORIUM</i> SP.....	21
5.4. PRETRATAMIENTO ELECTROQUÍMICO.....	23
5.4.1 <i>Caracterización del reactor electroquímico</i>	23
5.4.2 <i>Determinación del tiempo de germinación</i>	24
5.4.3 <i>Exposición de conidios a CE</i>	24
5.5. EFECTO DEL HONGO PRETRATADO SOBRE <i>D. VISCOSA</i> EN PRESENCIA DEL Pb.....	24
5.6. MÉTODOS ANALÍTICOS	25
5.6.1 <i>Viabilidad de conidios</i>	25
5.6.2 <i>Crecimiento superficial y biomasa fúngica</i>	25
5.6.3 <i>Melanina</i>	26
5.6.4 <i>Actividad antioxidante en Cladosporium sp.</i>	26
5.6.5 <i>Crecimiento (D. viscosa)</i>	27
5.6.6 <i>Pigmentos fotosintéticos</i>	27
5.6.7 <i>pH</i>	27
5.6.8 <i>Pb en raíces y tallo</i>	27
5.6.9 <i>Actividad G-POX de D. viscosa</i>	28
5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
6.1. TOLERANCIA AL Pb POR <i>D. VISCOSA</i> ASOCIADA A <i>CLADOSPORIUM</i> SP.	29

6.1.1	<i>Escarificación de semillas</i>	29
6.1.2	<i>Tolerancia al Pb por la asociación planta-hongo</i>	31
6.2	PRETRATAMIENTO ELECTROQUÍMICO.....	35
6.2.1	<i>Condiciones de operación del reactor electroquímico</i>	35
6.2.2	<i>Germinación de los conidios y efecto de la CE en el crecimiento de Cladosporium sp.</i>	36
6.2.3	<i>Efecto de la CE sobre mecanismos de defensa en Cladosporium sp.</i>	42
6.3	EFFECTO DE <i>CLADOSPORIUM</i> SP. PRETRATADO SOBRE LA TOLERANCIA AL Pb EN <i>D. VISCOSA</i>	45
6.3.1	<i>Crecimiento</i>	46
6.3.2	<i>Pigmentos fotosintéticos y respuesta antioxidante</i>	48
6.3.3	<i>Contenido de Pb en tejidos vegetales</i>	52
7	CONCLUSIONES	56
8	PERSPECTIVAS	57
9	BIBLIOGRAFÍA	58

Abreviaturas

APX: Ascorbato peroxidasa	H ₂ O ₂ : Peróxido de hidrógeno
AsA: Ácido ascórbico	IT: Índice de tolerancia
CAT: Catalasa	mA: Miliamperios
CE: Corriente eléctrica	MDHA: Mono-dehidroascorbato
Cl ₅₀ : Concentración inhibitoria media	MDHAR: Mono-dehidroascorbato reductasa
DHA: Dehidroascorbato	MP: Metales pesados
DHAR: Dehidroascorbato reductasa	MS: Murashige & Skoog
DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo	MT: Metalotioneínas
DSE: Hongos endófitos septados oscuros	O ₂ : Oxígeno
Dv: <i>Dodonaea viscosa</i>	¹ O ₂ : Oxígeno singulete
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	O ₂ ^{-•} : Radical superóxido
ERO: Especies reactivas de oxígeno	OH [•] : Radical hidroxilo
FQ: Fitoquelatinas	PDA: Agar papa dextrosa
FT: Factor de translocación	Pb: Plomo
G-POX: Guayacol peroxidasa	PF: Peso Fresco
GPX: Glutación peroxidasa	PS: Peso Seco
GR: Glutación reductasa	POX: Peroxidasas (no específica)
GSSG: Glutación disulfuro	SOD: Superóxido dismutasa
GSH: Glutación	TCA: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
GST: Glutación S-transferasa	UFC: Unidades formadoras de colonias
H: Hongo (<i>Cladosporium</i> sp.)	
H _{CE} : Hongo (<i>Cladosporium</i> sp.) pretratado	

Índice de tablas

Tabla 1. Descripción de las fases observadas en la germinación de semillas de <i>D. viscosa</i>	21
Tabla 2. Ajuste de la fuente de Nitrógeno con KNO_3 para todas las concentraciones de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	22
Tabla 3. Acumulación de Pb y factor de translocación en plantas de <i>D. viscosa</i> en las diferentes condiciones analizadas, después de 50 días de cultivo.	53

Índice de figuras

Figura 1. Daño oxidativo inducido por metales pesados en células vegetales, modificado de Hossain et al., (2012).	5
Figura 2. <i>Dodonaea viscosa</i> .	12
Figura 3. Estrategia experimental.	19
Figura 4. Reactor electroquímico y fuente de poder.	23
Figura 5. Porcentaje y vigor de germinación de semillas de <i>D. viscosa</i> expuestas a tres tratamientos de escarificación.	30
Figura 6. Biomasa de plantas de <i>D. viscosa</i> peso seco (PS). Expuestas a diferentes concentraciones de Pb.	32
Figura 7. Índice de tolerancia (IT) de <i>D. viscosa</i> .	34
Figura 8. Caracterización del reactor electroquímico.	35
Figura 9. Porcentaje de germinación de los conidios de <i>Cladosporium</i> sp.	37
Figura 10. Porcentaje de viabilidad en esporas de <i>Cladosporium</i> sp.	38
Figura 11. Crecimiento de <i>Cladosporium</i> sp. después de aplicar diferentes intensidades de CE.	39
Figura 12. Crecimiento superficial de <i>Cladosporium</i> sp expuesto a distintas intensidades de CE.	40
Figura 13. Densidad de biomasa de <i>Cladosporium</i> sp expuesto a distintas intensidades de CE.	41
Figura 14. Contenido de melanina en la biomasa de <i>Cladosporium</i> sp. expuesto a distintas intensidades de CE.	43
Figura 15. Actividad antioxidante de <i>Cladosporium</i> sp. expuesto a distintas intensidades de CE.	44
Figura 16. Crecimiento de <i>D. viscosa</i> después de 50 días de cultivo, en ausencia y presencia de Pb (2000 mg/kg), e inoculadas con <i>Cladosporium</i> sp (1×10^6 UFC/mL) con y sin pretratamiento con CE.	46
Figura 17. Biomasa (PF: peso fresco) de <i>D. viscosa</i> en las diferentes condiciones analizadas, después de 50 días de cultivo.	47
Figura 18. Concentración de pigmentos fotosintéticos en plantas de <i>D. viscosa</i> en las diferentes condiciones analizadas.	49
Figura 19. Actividad de la enzima Guayacol peroxidasa (G-POX) en plantas de <i>D. viscosa</i> en las diferentes condiciones analizadas.	51
Figura 20. Contenido de Pb en plantas de <i>D. viscosa</i> en las diferentes condiciones analizadas.	53

Resumen

La contaminación por metales pesados (MP) representa un riesgo para diversos ecosistemas, ya que esta clase de contaminación no es susceptible a degradación. En los suelos, la manera de enfrentar este tipo de contaminación es mediante la extracción o estabilización de los MP, a través de estrategias de remediación con enfoques físicos, químicos y biológicos; siendo las estrategias con enfoque biológico (biorremediación) las más prometedoras, debido a su bajo impacto en el ambiente. No obstante, las estrategias de biorremediación tienen limitaciones relacionadas con la concentración del contaminante y al ambiente del área a remediar. Debido a esto, en diversas investigaciones se sugiere inducir modificaciones o alteraciones en los organismos involucrados, que aumenten la tolerancia a los factores limitantes, con el propósito de mejorar los procesos de biorremediación.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de un inóculo de esporas germinadas de *Cladosporium* sp. expuestas a una corriente eléctrica (10 mA: 12 h), sobre la tolerancia y acumulación de plomo (Pb) en plantas de *Dodonaea viscosa*. Se encontró que el inóculo pretratado con corriente eléctrica tuvo un impacto positivo en la tolerancia de las plantas al Pb, aumentando la biomasa de tallos y raíces (2.3 veces), así como el contenido de clorofilas a (1.8 veces) y b (2.9 veces), comparadas con plantas expuestas a Pb sin inocular, mientras que las plantas inoculadas con el hongo sin pretratamiento mostraron un incremento en la biomasa de tallos y raíces de 1.6 y 1.7 veces y las clorofilas aumentaron 1.15 y 1.5%. En cuanto a la bioacumulación de Pb, se observó que la concentración del metal disminuyó en tallos (72%) y raíces (50%), por efecto del hongo pretratado, respecto a las plantas sin inóculo expuestas al contaminante.

Los resultados obtenidos indican que la inoculación de *D. viscosa* con *Cladosporium* sp. (expuesto a corriente eléctrica) tiene efectos benéficos sobre la tolerancia y acumulación de Pb en la planta, con una posible aplicación en estrategias de fitorremediación asistida por hongos, enfocadas en la fitoestabilización de MP.

Palabras clave: inóculo, corriente eléctrica, *Dodonaea viscosa*, plomo, tolerancia, fitoestabilización.

Abstract

Heavy metal (HM) contamination poses a risk to various ecosystems, as this type of contamination is not susceptible to degradation. In soils, this type of contamination is addressed by extracting or stabilizing the HMs through remediation strategies with physical, chemical, and biological approaches. Biological approaches (bioremediation) are the most promising due to their low environmental impact. However, bioremediation strategies have limitations related to the concentration of the contaminant and the environment of the area to be remediated. Because of this, various studies suggest inducing modifications or alterations in the organisms involved, which increase tolerance to limiting factors, in order to improve bioremediation processes.

The objective of this study was to evaluate the effect of an inoculum of germinated spores of *Cladosporium* exposed to an electric current (10 mA: 12 h.), on the tolerance and accumulation of lead (Pb) in *Dodonaea viscosa* plants. It was found that the inoculum pretreated with electric current had a positive impact on plant tolerance to Pb, increasing stem biomass (2.325 times) and root biomass (2.3 times), as well as chlorophyll a (1.8 times) and b (2.9 times) content, compared to uninoculated Pb-exposed plants, while plants inoculated with the fungus without pretreatment showed an increase in stem and root biomass of 1.6 and 1.7 times and chlorophylls increased 1.15 and 1.5%. Regarding Pb bioaccumulation, it was observed that the metal concentration decreased in stems (72%) and roots (50%) due to the pretreated fungus compared to plants without inoculum exposed to the contaminant.

The results indicate that inoculation of *D. viscosa* with *Cladosporium* (exposed to electric current) has beneficial effects on Pb tolerance and accumulation in the plant, with potential application in fungal-assisted phytoremediation strategies focused on MP stabilization.

Keywords: inoculum, electric current, *Dodonaea viscosa*, lead, tolerance, phytostabilization.

Introducción

El aumento de suelos contaminados con metales pesados (MP) en las últimas décadas ha provocado una gran amenaza para el medio ambiente y la salud humana. Se conocen cerca de 5 millones de sitios contaminados por MP o metaloides que cubren 500 millones de hectáreas de suelo (Liu *et al.*, 2018). La contaminación del suelo por MP tiene distintos orígenes. Por ejemplo, diversos materiales parentales del suelo son fuente natural de metales pesados como el plomo (Pb), cromo (Cr), arsénico (As), zinc (Zn), cadmio (Cd), cobre (Cu), mercurio (Hg) y níquel (Ni), que son considerados como contaminantes cuando superan ciertos niveles críticos en el medio ambiente (Muthusaravanan *et al.*, 2018). Sin embargo, la principal fuente de contaminación son las actividades antropogénicas como: quema de combustibles con plomo, relaves mineros, industria de pintura, fertilizantes químicos, plaguicidas, compost y aguas residuales aplicadas a campos agrícolas, así como derrames de productos petroquímicos (Sánchez-Castro *et al.*, 2023).

La presencia de altas concentraciones de MP en la ambiente resulta alarmante, debido a que, a diferencia de la mayoría de los compuestos orgánicos, estos no están sujetos a degradación metabólica por lo que pueden acumularse en los tejidos de diversos organismos. Los MP pueden ingresar al cuerpo humano al consumir alimentos contaminados y plantear diversos riesgos para la salud (enfermedades renales, disfunción tubular renal y daño óseo) (Xie *et al.*, 2018).

Dada la toxicidad de los MP, se han planteado distintas estrategias para la detoxificación de los suelos que presentan este tipo de contaminación. Su eliminación del suelo requiere enfoques tecnológicos efectivos y soluciones rentables, especialmente porque se consideran un grupo único de contaminantes que no se pueden degradar de manera química o biológica (Cameselle *et al.*, 2019).

Para el tratamiento de suelos contaminados con MP, se ha recurrido al uso de métodos físicos y/o químicos que incluyen el intercambio iónico, ósmosis inversa, reducción química, precipitación y evaporación (Gong *et al.*, 2018). Todos estos pueden aplicarse con éxito al proceso de descontaminación, pero requieren muchos recursos externos y en la mayoría de los casos son demasiado costosos para su uso a gran escala (Liu *et al.*, 2018). Por estas razones, en las últimas décadas se ha prestado cada vez más atención a los procesos de

fitorremediación, en los que las plantas absorben y estabilizan los contaminantes, para detoxificar y limpiar los ambientes contaminados (Yadava *et al.*, 2018).

La fitorremediación es una tecnología prometedora y efectiva con pocos impactos negativos. Sin embargo, la biodisponibilidad de MP en el suelo y la baja biomasa vegetal restringen la eficiencia de esta tecnología (Zhu *et al.*, 2020).

Recientemente se han explorado diferentes enfoques para la optimización de los sistemas de fitoextracción, señalando la importancia de la cooperación entre las plantas con capacidad fitorremediadora y los microorganismos que promueven el crecimiento, la tolerancia y acumulación de metales en las plantas (Marfuah *et al.*, 2024). Entre estos microorganismos, las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, bacterias endófitas, hongos micorrízicos arbusculares, hongos ectomicorrízicos y los hongos endófitos septados oscuros (DSE), son conocidos como los principales impulsores del crecimiento de las plantas en condiciones de estrés abiótico (Otero-Blanca *et al.*, 2018).

Aunque estas asociaciones entre planta-microorganismo mejora los procesos de fitorremediación de suelos contaminados con MP, se han propuesto estrategias para mejorar su eficiencia en los procesos de fitorremediación en este tipo de suelos. Entre estas estrategias se encuentra la exposición de organismos a condiciones de estrés, con el fin de inducir variaciones en el metabolismo microbiano (Huang *et al.*, 2012), e incrementar la resistencia en los organismos involucrados en procesos de remediación.

En este sentido, se puede hacer uso de una corriente eléctrica de intensidad controlada, ya que se ha reportado que, en algunas situaciones, la exposición a un campo eléctrico puede estimular la actividad metabólica de organismos involucrados en procesos biotecnológicos, incluidas las técnicas biológicas de descontaminación (Beretta *et al.*, 2019)

En el presente trabajo se evaluó el impacto de un pretratamiento electroquímico a las esporas del hongo endófito septado oscuro *Cladosporium* sp. (viabilidad, crecimiento y compuestos antioxidantes), además del efecto sobre el crecimiento de *Dodonaea viscosa* y la capacidad para acumular plomo, cuando ambos organismos se encuentran asociados.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Contaminación de suelo por metales pesados (MP)

En términos de la química, los MP se refieren a metales y metaloides con peso atómico superior a 60 unidades de masa atómica (u) y una densidad superior a 5 g/cm³, como el cadmio (Cd), el mercurio (Hg), el cobre (Cu), el plomo (Pb), cromo (Cr), níquel (Ni) y zinc (Zn) (Campillo-Cora *et al.*, 2025).

Los MP pueden ser tóxicos para plantas y animales, debido a su capacidad para unirse a ligandos específicos de moléculas orgánicas, como; grupos sulfhidrilo (SH⁻), amino (NH₂), fosfato (PO₄⁻), carboxilo (COO⁻) e hidroxilo (OH⁻). Esta unión puede ocasionar la activación o inhibición de enzimas y otras proteínas involucradas en el metabolismo provocando un efecto tóxico para los organismos (Aslam *et al.*, 2021).

La contaminación por MP es persistente e irreversible, y su presencia y/o acumulación se debe principalmente al aumento en las actividades antropogénicas que han contribuido a la generación de desechos sólidos tóxicos, que se han convertido en una amenaza a nivel mundial (Naveen *et al.*, 2017). Entre las fuentes antropogénicas que contribuyen a la contaminación de suelos por MP y otros elementos tóxicos se encuentra la industrialización, la urbanización y las prácticas agrícolas intensivas (Shahid *et al.*, 2015).

Ciertas prácticas industriales como, la extracción, el procesamiento y el uso de metales en las industrias metalúrgicas producen contaminación directa. Por ejemplo, durante la extracción de minerales metálicos se producen grandes cantidades de rocas que contienen MP en bajas concentraciones y estos pueden contaminar el suelo y los cuerpos de agua circundantes por lixiviación química o biológica. No obstante, la mayoría de las industrias producen contaminación indirectamente, por ejemplo, a través de la liberación de metales por la quema de combustibles fósiles (Campillo-Cora *et al.*, 2025).

Por otro lado, la urbanización genera grandes cantidades de desechos domésticos, aguas residuales y lodos de alcantarillado, que son fuentes potenciales de MP en los suelos, favoreciendo la contaminación a los cultivos, las aguas subterráneas y superficiales, que pueden llegar a utilizarse para beber (Fernández *et al.*, 2014). Por ejemplo, el uso indiscriminado de fertilizantes químicos y plaguicidas durante las prácticas agrícolas son una fuente de contaminación de MP, debido a la presencia de As (V/III), Hg (II), Pb (II) y Cu(II). Aunque, el nivel de toxicidad de estos elementos depende de su persistencia en

suelos y su estado de oxidación (Sánchez-Castro *et al.*, 2023). Los MP son considerados los contaminantes más persistentes y complejos para remediar en la naturaleza. No solamente alteran negativamente la calidad de la atmósfera, cuerpos de agua y cultivos de alimentos, también amenazan la salud y bienestar de animales y seres humanos, a través de su acumulación en la cadena alimentaria (Jacob *et al.*, 2018).

1.2. Efecto del plomo (Pb) en los organismos

Desde hace aproximadamente cuatro décadas se ha informado sobre el impacto de algunos MP en la salud humana que, en su mayoría, es resultado del consumo de alimentos contaminados (Nogawa *et al.*, 1987). La exposición al Pb puede causar convulsiones y trastornos del comportamiento. En niños puede afectar el desarrollo del cerebro, reducción del cociente intelectual y dificultades de aprendizaje. También puede ser causante de anemia, hipertensión, disfunción renal, inmunotoxicidad y toxicidad reproductiva. En adultos, el plomo entra al organismo pasando a la sangre y acumulándose en los huesos. En particular, en mujeres embarazadas, el plomo almacenado en los huesos puede volver a circular por la sangre provocando un riesgo en el desarrollo del feto al aumentar la presión arterial, o provocando un nacimiento prematuro (Caravanos *et al.*, 2014). La amenaza de los MP para la salud humana y animal se agrava por su baja movilidad ambiental, incluso bajo altas precipitaciones, y su persistencia a largo plazo en el medio ambiente (Padhan *et al.*, 2021).

La presencia de los MP en los suelos también tiene un efecto nocivo sobre las plantas (Figura 1), causando toxicidad directa o indirecta. Los efectos de una toxicidad directa tienen que ver con daños a nivel genético, al interactuar con biomoléculas formando enlaces cruzados ADN-ADN o ADN-proteína que, de no ser reparados por los puntos de control celular, conducen a la muerte de la planta. Mientras que la toxicidad indirecta causa afectaciones de tipo oxidante, es decir, la oxidación de proteínas, lípidos y ADN que conduce a peroxidación lipídica y alteraciones en la función celular; el estrés oxidante inducido por MP activa mecanismos de defensa enzimáticos y no enzimáticos, pero si los mecanismos antioxidantes son sobrepasados se producen alteraciones en el metabolismo y crecimiento, y en algunas ocasiones la muerte de la planta (Hosseini *et al.*, 2012).

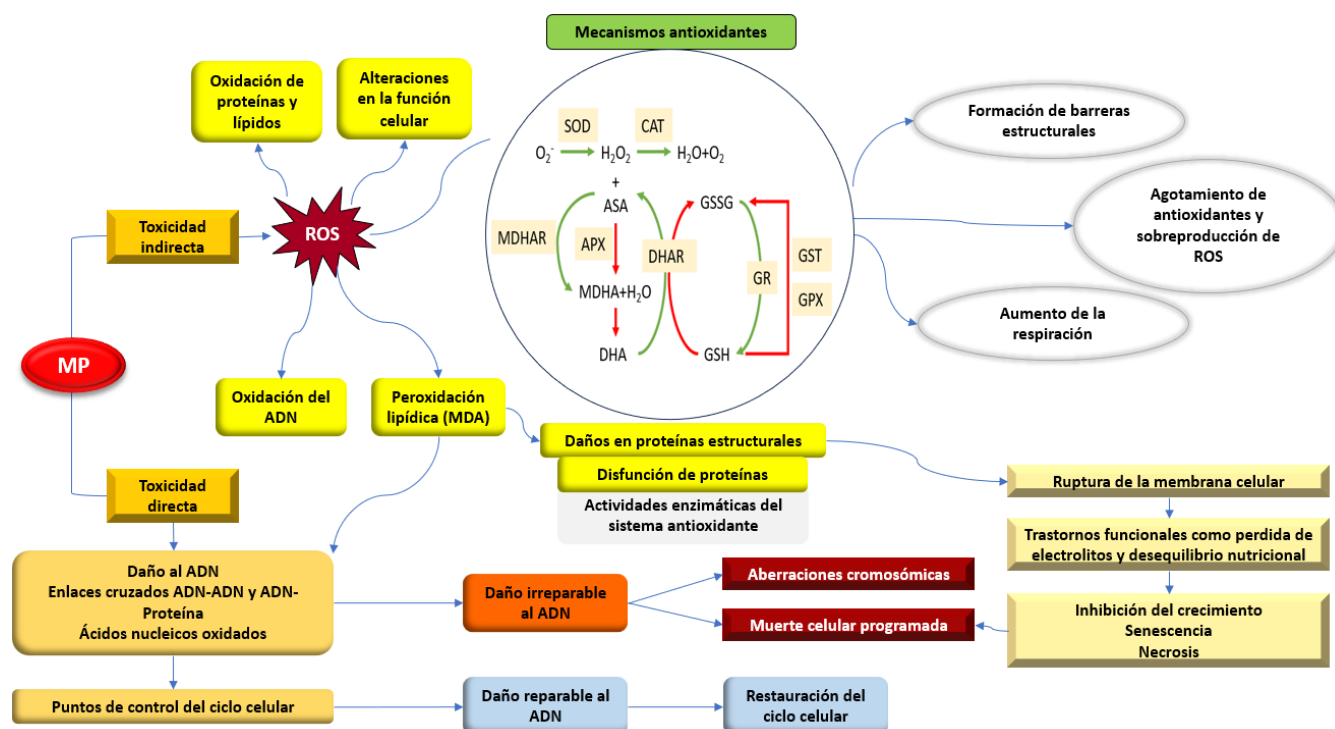


Figura 1. Daño oxidativo inducido por metales pesados en células vegetales, modificado de Hossain et al., (2012). SOD: Superóxido dismutasa, CAT: Catalasa APX: Ascorbato peroxidasa, MDHAR: Mono dehidroascorbato reductasa, DHAR: Dehidroascorbato reductasa, GR: Glutación reductasa GST: Glutación S-transferasa, AsA: Acido ascórbico, DHA: Dehidroascorbato, GSSG: Glutación oxidado, GSH: Glutación reducido.

Por ejemplo, la exposición a elementos como Pb, Cd, Hg y As, que no desempeñan ningún papel en el crecimiento de las plantas, han registrado efectos adversos como deficiencias en la biosíntesis de clorofila, transporte de electrones y enzimas del proceso fotosintético debido al estrés oxidante generado (Aslam *et al.*, 2021). La mayor parte de la disminución en los parámetros de crecimiento de las plantas que crecen en suelos contaminados se atribuye a la reducción de las actividades de fotosíntesis, la nutrición y la reducción de la actividad de algunas enzimas involucradas en la respuesta al estrés oxidante (Mansoor *et al.*, 2023).

Los microorganismos del suelo son a menudo los primeros en entrar en contacto con los HM en la matriz del suelo debido a su amplia presencia, movilidad y alta relación superficie/volumen, lo que lleva a una mayor exposición a los HM. Estos desempeñan papeles esenciales en varias funciones y servicios del suelo como, el mantenimiento de los ciclos biogeoquímicos, la creación y el mantenimiento de la estructura del suelo y el control de enfermedades de las plantas (Coban *et al.*, 2022). Cuando los HM se acumulan en los suelos pueden comprometer las funciones y servicios microbianos, debido a la disminución

de la carga microbiana, lo que puede afectar la calidad del suelo y los servicios ecosistémicos (Iordache y Neagoe, 2023). Debido a su sensibilidad a los cambios y sus papeles cruciales en los procesos del suelo, las propiedades microbianas se utilizan ampliamente como indicadores de la contaminación por HM y la calidad del suelo (Campillo-Cora *et al.*, 2025)

1.3 Remediación de suelos contaminados con MP

Para la recuperación de ambientes contaminados se han desarrollado una variedad de técnicas de remediación como el lavado del suelo, la inmovilización de contaminantes y la fitorremediación. Hoy en día se siguen evaluando diversas estrategias, convencionales y no convencionales, para la remoción de MP en matrices ambientales, considerándose un trabajo desafiante con respecto a la complejidad técnica y el costo (Sánchez-Castro *et al.*, 2023). Estas estrategias se basan en enfoques fisicoquímicos y biológicos.

1.3.1 Tratamientos fisicoquímicos

La excavación, lavado de suelo, y la estabilización de contaminantes son algunas de las estrategias fisicoquímicas que se utilizan para la atenuación de elementos contaminantes en el suelo.

Excavación

De manera tradicional, la excavación y la mezcla del suelo contaminado con suelo “limpio” eran los métodos más empleados para limpiar los sitios contaminados. El objetivo en estos procesos es la dilución de la concentración de MP en el suelo y, a su vez, aumentar su funcionalidad. No obstante, en varios países está prohibida debido al riesgo de pérdida de fertilidad del suelo (Padhan *et al.*, 2021).

Lavado de suelo

El lavado del suelo, por otro lado, es un método útil en la eliminación de contaminantes del suelo mediante el uso de agua o una solución de lavado adecuada, que sirven en el proceso de extracción o recuperación de metales, compuestos orgánicos y contaminantes del aceite como el fenol. Estas soluciones son preparadas a partir de ácidos naturales y/o bases, agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el ácido etilendiamino-N,N'-disuccínico (EDDS) o sustancias húmicas y surfactantes que se diluyen en agua. La eficiencia del lavado del suelo depende de la capacidad del extractante para disociar los metales del suelo (Kumar *et al.*, 2020).

Inmovilización de contaminantes

Los MP pueden inmovilizarse en el suelo mediante la formación de complejos, precipitación y adsorción. La inmovilización se realiza mediante la adición de agentes inmovilizadores como son: los i) carbonatos (cal), ii) fosfatos (harina de huesos, fosfato de amonio, apatita e hidroxiapatita), iii) agentes alcalinos (cenizas volantes e hidróxido de calcio), iv) arcilla y minerales que contienen hierro (bauxita, lodo rojo, goethita, arena verde, tamices moleculares, paligorskita, gel de sílice, vermiculita y zeolitas) y v) materia orgánica (quitosano, xantato de almidón, turba, compost, estiércol, carbón activado y biocarbón) (Liu *et al.*, 2018). En general, estas enmiendas reducen la biodisponibilidad y el potencial de lixiviación de los MP al inducir una variedad de procesos fisicoquímicos que incluyen precipitación, coprecipitación, complejación y adsorción superficial (Padhan *et al.*, 2021).

La estabilización térmica de MP, o vitrificación, es un método de solidificación/estabilización que requiere energía térmica (1400–2000 °C), la cual se logra mezclando el suelo contaminado con precursores vítreos, calentando las mezclas hasta su licuefacción y obteniendo un vidrio amorfo y homogéneo tras el enfriamiento del líquido. Los metales pesados pueden inmovilizarse mediante dos interacciones principales con la matriz vítrea: enlace químico y encapsulación (Li *et al.*, 2019).

1.3.2 Tratamientos biológicos

Biorremediación

La biorremediación es otro método para el tratamiento de la contaminación; se trata de una técnica sostenible, asequible y segura (Patel *et al.*, 2022). Esta tecnología implica el uso de organismos como bacterias, hongos y plantas. Especialmente las bacterias y hongos han demostrado ser eficaces en la remediación de contaminantes ambientales debido a su fácil crecimiento, su rápido periodo de crecimiento y su fácil manipulación (Ayilara y Babalola, 2023).

Estos organismos pueden eliminar contaminantes del medio ambiente mediante diferentes mecanismos de movilización e inmovilización. El proceso de movilización implica la oxidación enzimática, la bioestimulación, la bioaumentación y la reducción enzimática. Por otro lado, la inmovilización incluye la bioacumulación, la complejación, la biosorción y la precipitación (Verma y Kuila, 2019).

Se ha reportado que los hongos presentan una tolerancia significativa a los MP criterio por el cual se opta por su aplicación en el campo de la biorremediación (Kumar y Dwivedi,

2021). Hongos de los generos *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Cladosporium* tienen la capacidad de atrapar MP mediante adsorción y absorción (Jacob *et al.*, 2018; Marfuah *et al.*, 2024)

Fitorremediación

La fitorremediación es una tecnología que emplea plantas denominadas metalofitas, en el caso se contaminación por MP, puesto que, estas presentan una o más características morfológicas, anatómicas y bioquímicas que les brindan tolerancia a los MP (Akhatar *et al.*, 2022). La tolerancia a MP en las plantas, se refiere a la capacidad inherente que tienen de soportar concentraciones toxicas de estos sin recibir algún daño. La tolerancia difiere de la resistencia, puesto que esta última, es una capacidad adquirida para sobrellevar los efectos nocivos por la presencia de MP (Papa *et al.*, 2000). Dentro de los mecanismos de la fitorremediación se encuentran: i) la fitoextracción, ii) la fitoestabilización, iii) la fitovolatilización y la iv) fitodegradación (Kong y Glick, 2017) de los cuales, la fitodegradación es el único que no es aplicable a MP. La fitoextracción se refiere a la absorción de contaminantes del suelo o el agua por las raíces de las plantas y su translocación hacia la parte aérea, o cualquier otra parte cosechable de la planta, para eliminar los contaminantes y promover la limpieza del suelo a largo plazo (Gupta *et al.*, 2024). Por otra parte, la fitoestabilización tiene como objetivo reducir la movilidad y la biodisponibilidad de los contaminantes en el medio ambiente (Radziemska *et al.*, 2018). La fitovolatilización es el uso de plantas para absorber elementos volátiles (Hg, Se y As) y luego convertirlos en formas volátiles y de esta manera liberarlos a la atmósfera. La fitodegradación es la transformación de contaminantes orgánicos por procesos metabólicos de las plantas (Kong y Glick, 2017).

Dentro de estos mecanismos, la fitoestabilización ha demostrado un gran potencial para disminuir la toxicidad de los MP presentes en suelo, además de ser una estrategia económica y poco invasiva (Kumar *et al.*, 2020). La fitoestabilización se basa, entre otras cosas, en una cobertura vegetal permanente que contribuye a la reducción de problemas de erosión y lixiviación de los MP (Montiel-Rozas *et al.*, 2015); así como, minimizar su movilidad y disponibilidad en el medio ambiente, evitando su transferencia a los eslabones posteriores de la cadena alimentaria y la migración de iones tóxicos a las aguas subterráneas. El objetivo de la fitoestabilización no es eliminar los MP de la zona contaminada, sino estabilizarlos y reducir el riesgo para la salud humana y el medio ambiente.

Fitorremediación asistida por microorganismos

La fitorremediación asistida por microorganismos es una técnica de remediación que se basa en el uso de plantas asociadas con microorganismos, los cuales confieren a las plantas resistencia a ambientes contaminados. Esta interacción incluye rizobacterias promotores del crecimiento vegetal (RPCV), ectomicorrizas o endomicorrizas e incluso algunos microorganismos endófitos (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015), mismos que pueden regular el sistema fotosintético, el sistema antioxidante y la estructura de la pared celular de las plantas para mejorar la tolerancia de las plantas a los MP (Khare *et al.*, 2018). Por ejemplo, hongos, como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Cladosporium* y los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) tienen potencial para eliminar contaminantes del suelo al mejorar el proceso de fitorremediación (Qiu *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2023, Marfuah *et al.*, 2024; Quan *et al.*, 2023). La interacción de los hongos con plantas en suelos contaminadas con plomo ha sido estudiada por Yang *et al.* (2015), donde demuestran que la inoculación con hongos micorrízicos (*Funneliformis mosseae* y *Rhizophagus intraradices*) mejoró la absorción y acumulación de Pb en el sistema radicular, en contraste con las plantas no inoculadas. Y sugieren que los hongos micorrízicos arbusculares atenúan los efectos tóxicos de los metales pesados al inhibir su translocación en partes aéreas de la planta.

Particularmente, los hongos endófitos desempeñan funciones reguladoras importantes en la acumulación y tolerancia de metales en las plantas, su potencial de aplicación se ha subestimado durante muchos años (Domka *et al.*, 2019). Dado que las funciones de los hongos endófitos en la remediación de MP han sido exploradas de forma continua, es una técnica que en los últimos años ha despertado un creciente interés (Khalid *et al.*, 2021).

Por otra parte, los hongos endófitos septados oscuros (DSE), aislados de entornos contaminados con MP, como *Exophiala pisciphila*, *Gaeumannomyces cylindrosporus*, *Leptodontidium*, *Phialocephala* y *Phialophora/Cadophora*, tienen una tolerancia significativa a los iones de MP y, en particular, mejoran el crecimiento de las plantas (Berthelot *et al.*, 2016). Por ejemplo, *G. cylindrosporus*, aislado de relaves de minas de Pb-Zn en China, ha mostrado una alta tolerancia al Pb (Ban *et al.*, 2023). Asimismo, las cepas de *Acrocalymma vagum* NYN8C05 y NYN8G01 tienen el potencial de reducir significativamente el contenido de MP en las hojas de las plantas de tabaco (Jin *et al.*, 2018). La inoculación de *Phialophora mustea* mejoró la tolerancia al Cd y al Zn y el crecimiento de las plantas de tomate (Zhu *et al.*, 2018).

Otro beneficio del uso de los hongos DSE en la fitorremediación es su capacidad para ayudar a las plantas a contrarrestar la toxicidad generada por especies reactivas de oxígeno (ERO), inducidas por la presencia de MP. Este efecto se logra a través del sistema de eliminación activa de oxígeno, en el que la activación de la enzima superóxido dismutasa (SOD) constituye la primera línea de defensa para los hongos DSE (Li *et al.*, 2018). El aumento de la actividad de la SOD se acompaña de la activación de la enzima catalasa (CAT) y una serie de peroxidases (POD) (Yu *et al.*, 2021).

1.4 Mecanismos de tolerancia de las plantas a los MP

Con base en la capacidad natural de tolerancia de las plantas, se han identificado aproximadamente 500 taxa como hiperacumuladoras o estabilizadoras de uno o más metales, lo que quiere decir que menos del 0,2 % de los taxa, de aproximadamente 300, 000 plantas vasculares, presentan capacidad de fitorremediación (Li *et al.*, 2019). Esto indica que una gran variedad de plantas ha desarrollado diferentes mecanismos para tolerar la presencia de MP. Estos mecanismos de tolerancia varían entre las distintas especies de plantas y están determinados por el tipo de metal, eficiencia de absorción, translocación y estabilización, incluyendo, la síntesis de fitoquelatinas (FQs) y metalotioneinas (MTs), la acumulación de compuestos fenólicos, y la activación de sus sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Talebi *et al.*, 2019).

Dentro de los sistemas antioxidantes enzimáticos que presentan las plantas, se encuentran las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), diversas peroxidases (POD) y las del ciclo ascorbato-glutación (AsA-GSH). La SOD cataliza la conversión del $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 , en tanto que la CAT (en los peroxisomas) y POX (en el citosol y los cloroplastos) catalizan la transformación de H_2O_2 en H_2O y O_2 ; las POX oxidan simultáneamente un sustrato reducido como el AsA o el glutatión (GSH) en el ciclo AsA-GSH (Rahman *et al.*, 2024).

La superóxido dismutasa (SOD) incluye tres isoenzimas, Mn-SOD, CuZn-SOD y Fe-SOD. La Mn-SOD se encuentra principalmente en mitocondria y peroxisomas, aunque también se ha reportado en citosol. La Cu-Zn-SOD se ha encontrado en citosol, cloroplastos y mitocondria. La Fe-SOD ha sido reportada predominantemente en los cloroplastos (Malecka *et al.*, 2021). La catalasa (CAT) contiene Fe en su centro catalítico y se han reportado tres isoformas en *Zea mays*, CAT-1, CAT-2 y CAT-3 (Mir y Khah *et al.*, 2024). Por

otro lado, las peroxidasas en plantas están involucradas en funciones como la elongación celular, mecanismos de defensa y lignificación, hasta el momento se han reportado dos isoformas, POX I y POX II (Zhang *et al.*, 2023).

Por otra parte, dentro de los antioxidantes no enzimáticos se encuentra el ácido ascórbico (AsA) un regulador del estado redox de las células. Se puede encontrar en todos los compartimentos celulares y en las plantas es el más importante y, probablemente, el único en el apoplasto. El AsA es oxidado por el O_2 , $O_2^{\cdot-}$, 1O_2 y H_2O_2 para dar lugar al radical mono-dehidroascorbato (MDHA), el cual se descompone a dehidroascorbato (DHA) (Smirnoff, 2000). A través de sus formas oxidadas, el AsA participa en la regulación de la división y el desarrollo celular (Hasanuzzaman *et al.*, 2020).

El glutatión (GSH) actúa como un reductor para proteger los grupos tiol (R-SH) de enzimas, participa en la regeneración del AsA a partir de la reacción con 1O_2 y $OH^{\cdot}$, en la división celular, la floración y la detoxificación de xenobióticos y MP. La formación de glutatión disulfuro (GSSG) es una reacción dependiente de selenio donde participan las enzimas glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión S-transferasa (GST). El GSH es regenerado por la enzima glutatión reductasa (GR) utilizando NADPH como cofactor. Esta reacción se utiliza como indicadora del estado oxidativo de la célula y de la toxicidad celular (Sharma *et al.*, 2022).

El GSH es el precursor de las fitoquelatinas (FQ), que se sintetizan por la enzima fitoquelatina sintetasa (FQS) cuando la concentración del MP comienza a ser tóxica, aunque el gen que codifica para la FQS se expresa de manera constitutiva. Las FQs tienen la capacidad de unirse a los metales y secuestrarlos en la vacuola. Se ha documentado la síntesis de FQs como respuesta a la exposición al Pb y la formación de complejos FQs-Pb (Piechalak *et al.*, 2002) confirmando que su síntesis se presenta a concentraciones superiores a 700 μM de Pb (Kumar y Prasad, 2018).

Las metalotioneinas (MT) son polipéptidos de bajo peso molecular (4–8 kDa) que pueden unirse a las MP a través de los grupos tiol de sus residuos Cys. A estas moléculas se les atribuyen funciones como: a) participación en el mantenimiento de la homeostasis de las MP de transición esenciales, b) secuestro de MP tóxicas y c) protección contra el daño oxidativo intracelular (Zheng *et al.*, 2023). La organización o distribución de los residuos de cisteína confiere diferentes isoformas de MT y su capacidad para unirse y secuestrar diferentes iones HM para la desintoxicación y la homeostasis. La biosíntesis de MT está

regulada a nivel transcripcional y es inducida por diversos factores, como hormonas, agentes citotóxicos y HM, como Cd, Zn, Hg, Cu, Au, Ag, Co, Ni y Bi (Hossain *et al.*, 2012).

Los tocoferoles son lípidos isoprenoides sintetizados en los plástidos de plantas superiores, en estos sitios se han cuantificado en grandes cantidades. Son una de las primeras barreras de protección contra la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que tienen la capacidad de reaccionar con el $^1\text{O}_2$ (Singh *et al.*, 2016). Los tocoferoles (vitamina E), betacarotenos (vitamina A), fenoles (flavonoides, taninos, lignina, entre otros) y un grupo de quinonas (vitamina K) junto con el GSH, son capaces de donar electrones a especies oxidadas como los radicales libres y los lipoperóxidos, neutralizando de esta manera el potencial oxidativo de estos (Hasanuzzaman *et al.*, 2020).

1.5 *Dodonaea viscosa*

La especie de *D. viscosa* (Fig. 2) se conoce comúnmente como candela o jarilla. Es un arbusto perenne, que se caracteriza por su follaje denso. Las hojas son generalmente verdes o verde arbustivo, alternas y con bordes dentados. Produce flores discretas de color amarillo verdoso y dispuestas en racimos a lo largo del tallo. Es conocido por sus cualidades ornamentales y su tolerancia a condiciones adversas como la sequía (Malik *et al.*, 2022).



Figura 2. *Dodonaea viscosa*, arbusto (izquierda) y frutos (derecha).

Es una especie cosmopolita que presenta una extensa distribución geográfica en México. Las condiciones geográficas y ambientales en las que crece y se desarrolla no son factores determinantes para su distribución, ya que se puede encontrar en altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 2600 m, abarcando desde áreas desérticas hasta sitios afectados por la contaminación (Rzedowski y Rzedowski, 2001), ya que ha sido localizada creciendo en zonas mineras que contienen concentraciones importantes de relaves mineros.

Esta planta es una fuente valiosa de oligoelementos y produce metabolitos secundarios, que se emplean con fines terapéuticos, como de alcaloides, flavonoides, esteroides, compuestos fenólicos, saponinas, taninos, gomas, mucílagos, carbohidratos, azúcares reductores y glicósidos, así como. Además, *D. viscosa* posee efectos antidiabéticos, antimicrobianos, antioxidantes, citotóxicos, antifertilidad, cicatrizantes, antiinflamatorios, analgésicos, antiulcerosos, antiespasmódicos, antidiarreicos y desintoxicantes (Al-Snafi, 2017). Otra de las características interesante de la planta es su capacidad para estabilizar múltiples MP (Shakeel *et al.*, 2024), Demostrando su potencial para la remediación de sitios contaminados por MP como Cr, Ni, Co, Fe, Mn, Cu, Zn (Nawab *et al.*, 2016).

Por ejemplo, Rojas-Loria *et al.*, (2014) demostró que *D. viscosa* tolera hasta 2200 mg/kg de Pb sin presentar un efecto de fitotoxicidad, demostrando que es una planta con gran potencial para remediar sitios afectados con este metal.

1.6 Hongos endófitos septados oscuros (DSE)

Los endófitos fúngicos habitan dentro de los tejidos y órganos de plantas sanas durante al menos una etapa de su ciclo de vida, sin causar síntomas evidentes de infección (Poveda *et al.*, 2021). Estos hongos establecen una relación simbiótica estrecha con las plantas hospederas (Suryanarayanan y Shaanker 2021). Son considerados fuentes prometedoras de productos naturales potenciales con un amplio espectro de actividades biológicas. Además, los hongos DSE representan un grupo microbiano importante, estrechamente relacionado con la planta hospedera y el suelo de la rizósfera. Tienen un gran potencial para la protección ambiental y la restauración ecológica, ya que emplean mecanismos complejos para adaptarse al estrés por MP. La biorremediación que involucra hongos endófitos podría aumentar la resistencia de las plantas hospedera frente el estrés biótico y abiótico, mejorando así su eficiencia y capacidad de remediación (Khalid *et al.*, 2021).

Los DSE son hongos melanizados, que están adaptados a condiciones extremas, son capaces de resistir los efectos de ERO en las células hospederas debido a la síntesis de melanina que, por su estructura, inmoviliza iones metálicos, disminuyendo la toxicidad y contribuye a controlar el estrés oxidante generado como consecuencia de su entrada a las células (Li *et al.*, 2018). La simbiosis con DSE puede mejorar la absorción de nutrientes y agua en las plantas, así como aumentar su tolerancia al estrés ambiental y biótico (Jin *et al.*, 2018). Estos DSE son ubicuos y cosmopolitas, y se han encontrado en asociación con plantas en ambientes de estrés por MP. Algunos hongos DSE aislados de suelos

contaminados con MP poseen una alta tolerancia a estos iones y, en particular, favorecen el crecimiento de las plantas. Se ha reportado que la inoculación del hongo *Phialophora mustea* mejora la tolerancia de plantas de tomate al Cd y Zn promoviendo el crecimiento (Zhu *et al.*, 2018). Asimismo, se ha reportado que cepas de *Cladosporium* sp. pueden potenciar el crecimiento de *D. viscosa*, disminuyendo la bioacumulación de MP a través de mecanismos de exclusión, lo que incrementa su tolerancia a estos contaminantes (Anicacio, 2014). Los DSE también pueden ayudar a las plantas a eliminar la toxicidad de los MP mediante un sistema activo de eliminación de oxígeno, donde la activación de la superóxido dismutasa (SOD) podría actuar como la primera línea de defensa para DSE (Li *et al.*, 2018). El aumento en la actividad de la SOD va acompañado de la activación de la catalasa (CAT) y la peroxidasa (POD) (Yu *et al.*, 2021).

1.7 Preparación contra estrés “priming”

Todos los organismos en la naturaleza, especialmente aquellos que carecen de motilidad como los hongos, están expuestos a variaciones del medio ambiente, tales como cambios en la humedad, temperatura y osmolaridad, cambios que pueden inducir estrés en los organismos. Una forma de adaptarse a este estrés ambiental es mediante la retención de información de encuentros previos con eventos estresantes. Este proceso se conoce como "preparación para el estrés" y describe una plasticidad fenotípica en los rasgos de respuesta sin que haya un cambio subyacente en el genoma (Hilker *et al.*, 2015). Los eventos de estrés leves (“priming”) pueden inducir mecanismos de defensa, que pueden mejorar la resistencia a un evento de estrés más severo (“desencadenamiento”) después de una fase de recuperación intermedia. El sistema de preparación para el estrés se fundamenta en cambios moleculares y fisiológicos en respuesta al estrés ambiental (Liu *et al.*, 2022).

El potencial del priming por estrés ha sido ampliamente estudiado en diversas especies de plantas (Hu *et al.*, 2016). Sin embargo, en microorganismos, los estudios son más limitados, algunos de ellos han sido en *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum* *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (Verghese *et al.*, 2012, Guhr *et al.*, 2020). Se ha demostrado que el priming por estrés puede incrementar hasta diez veces las tasas de supervivencia de los microorganismos en comparación con aquellas en condiciones sin priming (Andrade-Linares *et al.*, 2016).

Recientes hallazgos revelan que el priming no solo ocurre en el micelio del hongo en crecimiento, sino también en los conidios (Castillo-Minjarez *et al.*, 2019). Esto permite que

el organismo libere una gran cantidad de propágulos preprogramados para sobrevivir mejor en las condiciones adversas en las que se formaron.

Las condiciones de preparación que mejoran la resistencia de los conidios frente a condiciones adversas tienen una gran relevancia agrícola y ambiental (Harish y Osherov, 2022). En este sentido, los microorganismos expuestos al priming pueden tener un potencial uso como inóculo en sitios contaminados o bajo estrés ambiental.

1.7.1 Corriente eléctrica para inducir estrés como estímulo

Se ha demostrado que la exposición a corriente eléctrica (CE) puede modificar la actividad metabólica de los microorganismos, estimulándola o inhibiéndola, lo que convierte a esta técnica en una herramienta útil para aplicaciones biotecnológicas, incluidas las estrategias para la recuperación de suelos contaminados por compuestos tóxicos.

Los efectos inducidos por la CE en la actividad biológica de los microorganismos están principalmente asociados con: (1) variaciones importantes en el pH, especialmente cerca de los electrodos; (2) reacciones electroquímicas que generan ERO o iones metálicos, dependiendo de las especies presentes en el sistema y los materiales de los electrodos; y (3) calentamiento excesivo debido a pérdida óhmica (Beretta *et al.*, 2019).

La CE puede inducir modificaciones en la fisiología y morfología de las células, así como en las propiedades físico-químicas de la membrana (Zimmermann *et al.*, 1973), provocando cambios en la permeabilidad, en el potencial de membrana, y el metabolismo (Luo *et al.*, 2005). Estos fenómenos varían según la especie, pero generalmente son proporcionales a la intensidad de la corriente aplicada y la duración de la exposición. Esto tiene como resultado, tanto la estimulación de la actividad microbiana y el aumento de la movilidad celular, como daños irreversibles en los microorganismos expuestos campos eléctricos más intensos, lo que lleva a la pérdida de la integridad de la membrana (Zituni *et al.*, 2014).

Hasta la fecha, no se ha estudiado el priming por estrés oxidante inducido mediante la corriente eléctrica en hongos filamentosos, ni su posible aplicación posterior. Sin embargo, el estrés oxidante es causado por diversos factores estresantes ambientales que afectan negativamente a los organismos y a la agricultura a nivel mundial. Por ello, resulta interesante explorar el potencial de estos microorganismos en condiciones adversas con aplicaciones enfocadas en la mitigación de problemas ambientales como la contaminación por elementos tóxicos, pérdida de diversidad y erosión del suelo.

2 JUSTIFICACIÓN

La contaminación por metales pesados es un tema de carácter global que impacta en la diversidad de los ecosistemas, la producción de alimentos y la salud humana. Para disminuir la presencia y toxicidad de estos elementos contaminantes es necesario el desarrollo de estrategias de remediación más eficientes que contribuyan en la restauración de ecosistemas, y garanticen la seguridad alimentaria.

La fitorremediación es una de las pocas técnicas que pueden usarse para la remoción de MP de los suelos, ecológicamente más amigable, que hace uso de plantas tolerantes a contaminantes para extraerlos del suelo. Sin embargo, presenta ciertas limitaciones como las condiciones fisicoquímicas del suelo (influyen en el desarrollo y crecimiento de la planta) y la concentración del contaminante (que debe estar dentro de los límites tolerables para la planta), por lo que han surgido nuevas alternativas para mejorar este proceso.

Una de estas alternativas es la fitorremediación asistida por microorganismos, en la cual se asocian plantas con microorganismos capaces de aumentar la tolerancia y la extracción de contaminantes. Estos microorganismos mejoran el crecimiento de las plantas e incluso les confieren resistencia contra una variedad de condiciones de estrés abiótico. Entre los microorganismos que cumplen con esas características se encuentran los hongos endófitos septados oscuros (DSE) que se asocian con plantas en condiciones de estrés, mostrando un efecto positivo en su crecimiento.

A su vez, las características benéficas de estos microorganismos pueden ser estimuladas a través de estrategias que modifiquen su metabolismo. Una de estas estrategias es el tratamiento electroquímico, que se basa en la aplicación de una corriente eléctrica controlada de baja intensidad sobre el microorganismo con el fin de inducir bajos niveles de estrés para modificar el metabolismo microbiano.

En este sentido, la inducción de asociaciones planta-microorganismo, así como el uso de estrategias para estimular a los microorganismos asociados puede permitir mejorar la eficiencia de la fitorremediación, proponiendo una estrategia novedosa para la solución del problema de la contaminación de los suelos por MP.

3 HIPÓTESIS

La inoculación de plantas de *Dodonaea viscosa* con el hongo endófito *Cladosporium sp.*, pretratado electroquímicamente, mejorará su tolerancia al plomo y su capacidad fitorremediadora.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Determinar el efecto de *Cladosporium* sp. pretratado electroquímicamente sobre el crecimiento de *Dodonaea viscosa* y su capacidad para fitoacumular Pb en un soporte modelo.

4.2 Objetivos específicos

- 1 Seleccionar las condiciones de operación para el tratamiento de conidios de *Cladosporium* sp. en un reactor electroquímico.
- 2 Determinar el efecto de distintas intensidades de corriente eléctrica sobre la fisiología de *Cladosporium* sp.
- 3 Evaluar la tolerancia al plomo por la asociación *D. viscosa*- *Cladosporium* sp.
- 4 Comparar el efecto de *Cladosporium* sp. tratado electroquímicamente sobre la tolerancia y fitoacumulación de Pb por *D. viscosa*.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Estrategia experimental

Con el propósito de evaluar la tolerancia y capacidad fitorremediadora de plomo de la planta *D. viscosa*, y la asociación de la planta con un hongo endófito del género *Cladosporium*, previamente sometido a una corriente eléctrica de baja intensidad, se planteó la siguiente estrategia experimental que consta de tres etapas (Fig. 3):

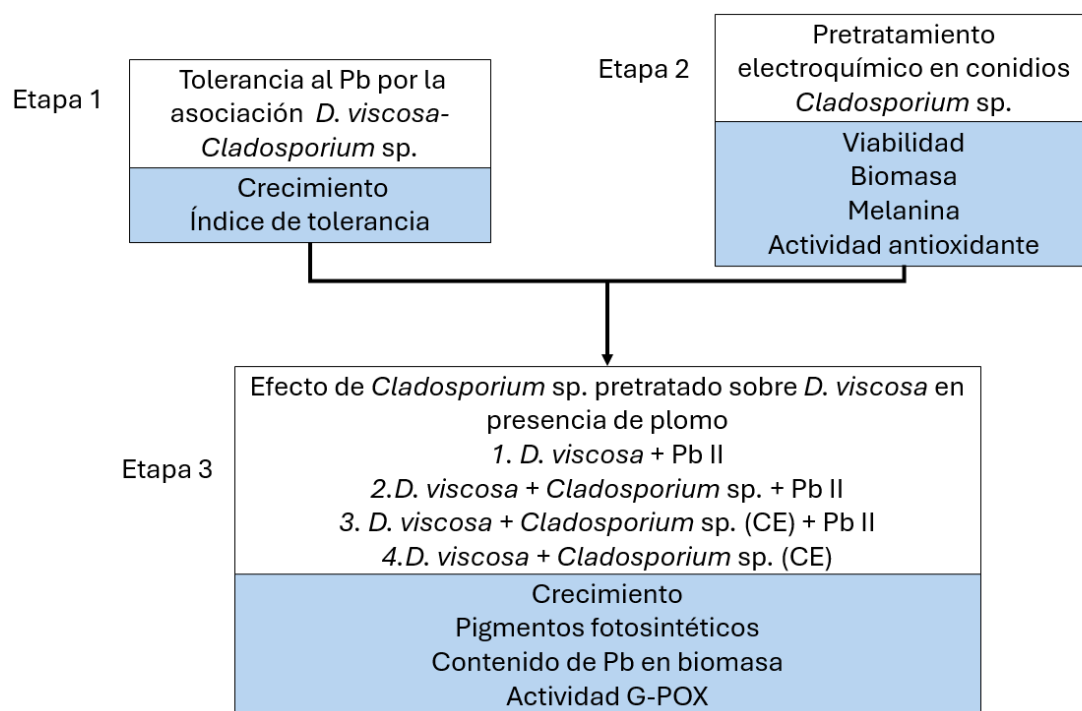


Figura 3. Estrategia experimental, los cuadros en azul representan las variables de respuesta de cada fase.

En la primera etapa, se realizaron pruebas de tolerancia al plomo en *D. viscosa* asociada con *Cladosporium* sp. Registrando el crecimiento de la planta (biomasa y longitud) para la obtención del índice tolerancia y con estos datos calcular la concentración media inhibitoria de Pb. Con los resultados obtenidos en esta etapa se hizo la selección de la concentración de plomo para la tercera etapa.

En la etapa dos, se seleccionaron las intensidades de corriente eléctrica a partir de la construcción del voltamperograma (Intensidad de corriente (mA) vs potencial de membrana (V)). Con las intensidades de CE seleccionadas se evaluó el efecto de la exposición de conidios germinados a la CE sobre la viabilidad, crecimiento, producción de melanina y

actividad antioxidante, basado en los efectos se seleccionó una intensidad de CE para los experimentos pertenecientes a la siguiente etapa.

Por último, en la tercera etapa, se evaluó el efecto de la inoculación con *Cladosporium* sp., pretratado electroquímicamente, en la tolerancia al Pb por la planta *D. viscosa*, cuantificando el crecimiento vegetal, contenido de clorofila, la acumulación del metal en la planta y la respuesta antioxidante G-POX.

5.2 Material biológico

5.2.1 Microorganismos y medio de cultivo

La cepa que se utilizó en el presente estudio fue *Cladosporium* sp. UAM12, que se encuentra disponible en la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares (CINVESTAV, México), este hongo fue aislado a partir de plantas de *D. viscosa*. La cepa fue resembrada por estría en cajas Petri con medio agar papa dextrosa (PDA), y se incubó por 14 días a 28°C. La cepa fue conservada en tubos de ensayo colocando porciones de medio PDA con micelio (1 cm²) con 14 días de cultivo en agua estéril, manteniéndolos en refrigeración a -4°C.

Para los estudios de asociación de la planta con el hongo, se realizó la cosecha de conidios con una solución estéril de Tween 80 al 0.05 %, a partir de cultivos de 14 días a 28° C en matraces Erlenmeyer (250 ml) con medio PDA (50 mL). Los conidios se contabilizaron en una cámara de Neubauer para la inoculación de reactores electroquímicos a una concentración de 1x10⁶ conidios/mL (Sección 5.4).

5.2.2 Plantas de *Dodonaea viscosa*

Para la obtención de las plantas, se utilizaron semillas de *D. viscosa*. Las semillas fueron seleccionadas mediante una prueba de flotabilidad, la cual consistió en colocar las semillas en agua, durante dos minutos; transcurrido este tiempo, las semillas que se mantuvieron en la superficie fueron descartadas y el resto se usó para la obtención de plántulas.

Las semillas seleccionadas fueron expuestas a tres distintos procesos de escarificación para promover la germinación: *térmico* (agua a 70°C, 3 min.), *sonicación* (15 min a 40°) y la combinación de *ambos tratamientos*. Posterior a la escarificación fueron sometidas a un tren de desinfección superficial que consistió en la inmersión de semillas en distintas soluciones en el siguiente orden: lavado con detergente comercial (2%, 30 min), etanol al

70% (30 segundos), hipoclorito de sodio (1.8%, 25 min). Las semillas se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces. Posterior al tratamiento, las semillas fueron sembradas en tubos de ensayo (50 ml) con medio Murashige & Skoog (MS, Sigma 5519), Phytigel (2 g/L, Sigma P8169), y sacarosa (10 g/L, Sigma S0389). Las semillas se mantuvieron en la oscuridad hasta la aparición del epicótilo y, posteriormente, se incubaron a 25°C con un fotoperiodo de 12 h.

Con el fin de conocer el método de escarificación más efectivo, se evaluó el porcentaje y el vigor de germinación a los 12 y 24 días respectivamente. El vigor de germinación, indica la capacidad de una semilla para dar origen a una planta con hojas verdaderas, y se evaluó siguiendo la metodología de Felizardo *et al.*, (2021), obteniendo un promedio de las puntuaciones asignadas a cada planta por condición probada, puntuación que varió de 0 a 5 respecto a las fases de germinación observadas (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción de las fases observadas en la germinación de semillas de *D. viscosa*.

Puntuación	Descripciones
0	No germinó
1	Ruptura del integumento
2	Alargamiento de la radícula
3	Formación de cotiledones
4	Aparición de la yema apical
5	Epicótilo y primer par de hojas abiertas

5.3 Pruebas de tolerancia al Pb: asociación *D. viscosa* con *Cladosporium* sp.

Para evaluar la tolerancia al plomo de la asociación entre *D. viscosa*-*Cladosporium* sp., se utilizó agrolita con un tamaño de partícula entre 0.4 – 2.8 mm. La agrolita fue lavada tres veces con agua destilada caliente y se luego secada a 60°C durante 48 h.

Los ensayos se realizaron en tubos de cultivo (180 ml) con 6 g (peso seco) de soporte, a los cuales se añadieron 17 mL de medio MS (73% de humedad), suplementando con 10 g/L de sacarosa como fuente de carbono y Pb, ajustando el pH a 5.7.

Las concentraciones de Pb utilizadas para evaluar la tolerancia fueron; 0, 1000, 2000, 3000, 4000 y 6000 mg/kg de agrolita seca. El Pb se añadió en forma de $Pb(NO_3)_2$ y la concentración de nitrógeno aportada por esta sal, se equilibró para todas las concentraciones con KNO_3 (Tabla 2).

Los tubos con el soporte se esterilizaron (15 lb/in², 15 min.) y, posteriormente, se trasplantaron plantas de entre 15 y 21 días de crecimiento, con 4 a 5 hojas verdaderas y una longitud de aproximadamente 5 cm de longitud. Las plantas se mantuvieron en un periodo de aclimatación de 7 días antes de la inoculación del soporte, cerca de las raíces, con 1 mL de una suspensión de conidios de *Cladosporium* sp. (1×10^6 conidios/mL).

Después de 40 días, las plantas fueron cosechadas, registrándose el peso seco y la longitud de tallos y raíces. Estos datos se emplearon para calcular el índice de tolerancia (IT) y la concentración inhibitoria media (CI_{50})

Tabla 2. Ajuste de la fuente de Nitrógeno con KNO_3 para todas las concentraciones de $Pb(NO_3)_2$.

Concentración de Pb (mg/kg)	$Pb(NO_3)_2$ (g/kg)	KNO_3 (g/kg)
0	0	5.85
1000	1.6	4.875
2000	3.2	3.9
3000	4.8	2.925
4000	6.4	1.95
6000	9.6	0

El IT se calculó aplicando la siguiente ecuación (Audet y Charest, 2007):

$$IT\% = \frac{\text{Biomasa de plantas con Pb}}{\text{Biomasa de plantas sin Pb}} * 100$$

La concentración inhibitoria media (CI_{50}) corresponde a la concentración de Pb que inhibe el 50% de la biomasa de la planta, respecto al valor máximo alcanzado sin Pb, y fue calculado a partir de una curva de dosis-respuesta del IT contra la concentración de Pb (Naumann et al., 2007). Con base al IT y la CI_{50} se seleccionó la concentración de Pb para los experimentos de la tercera etapa.

5.4 Pretratamiento electroquímico

5.4.1 Caracterización del reactor electroquímico

Se utilizaron reactores electroquímicos de vidrio (250 mL) con dos bocas a los costados para la entrada de los electrodos. Los electrodos utilizados fueron de titanio recubiertos con óxido de rutenio, con un área de contacto de 10 cm². Este tipo de electrodos favorece principalmente las reacciones de oxidación/reducción del agua, sin reacciones electroquímicas adicionales, y presentan una alta estabilidad y resistencia a la corrosión (Trasatti, 2000). La caracterización del reactor se realizó añadiendo 80 mL de una solución electrolítica (KH₂PO₄, 0.1 M) y aplicando diferentes intensidades de corriente eléctrica (CE, 1 – 500 mA) a través de los electrodos colocados en el interior del reactor. La CE se aplicó utilizando una fuente de poder G^WInstek (Figura 4). Para la caracterización del reactor se varió la CE (mA) y se registraron los potenciales de celda (V). Con estos datos se obtuvo una gráfica de intensidad de corriente (mA) contra potencial de celda (V), que permitió seleccionar el rango de intensidad de corriente para los experimentos posteriores.



Figura 4. Reactor electroquímico con electrodos de titanio cubiertos con óxido de rutenio (izquierda) y fuente de poder (derecha).

Los parámetros para la selección de las intensidades de CE fueron: pH, aumento en la temperatura y resistencia al paso de corriente a través del medio. Basados en esos parámetros se eligieron intensidades de CE en donde no se observaran cambios de pH drásticos, o aumento de temperatura que provocara un efecto de inhibición sobre el crecimiento.

5.4.2 Determinación del tiempo de germinación

El tiempo de germinación se evaluó con el propósito de determinar el momento adecuado para aplicar la CE, con la intención de evitar una inhibición del crecimiento en el hongo por efecto del estrés inducido. Para conocer el tiempo de germinación se inocularon 100µL de una suspensión de conidios de *Cladosporium* sp. (1×10^4 conidios/mL) en cajas Petri (90x15 mm) con agua-agar (1.5%) y se distribuyó en la superficie con una varilla de vidrio. Se cortaron cuadrados de agar de 1.5 x 1.5 cm, y se colocaron sobre un portaobjetos para observaciones microscópicas (Olimpus, 40x), de al menos 100 conidios cada dos horas durante 20 h. El tiempo de germinación se establece cuando más del 90% de conidios han germinado, considerando un conidio germinado cuando el tubo germinativo es igual o mayor al diámetro del conidio (Safavi *et al.*, 2007).

5.4.3 Exposición de conidios a CE

Se utilizaron 80 mL de una solución electrolítica (KH_2PO_4 , 0.1 M) para aplicar el tratamiento electroquímico sobre los conidios de *Cladosporium* sp. Los reactores electroquímicos fueron inoculados con 1 mL de una suspensión de 8×10^6 conidios/mL. Los conidios se mantuvieron a 28°C con agitación suave. Después de 72 horas de incubación, se aplicó la CE (0, 10, 30, 50 y 100 mA) durante 12 h. Después de este tiempo la CE fue retirada y se evaluó la viabilidad, la biomasa, contenido de melanina y actividad antioxidante, para la selección de una intensidad de CE. La intensidad seleccionada se aplicó sobre el inóculo empleado en los experimentos de la sección 5.5.

5.5 Efecto del hongo pretratado sobre *D. viscosa* en presencia del Pb

Para evaluar el efecto del Pb en plantas *D. viscosa* asociadas con *Cladosporium* sp. pretratado electroquímicamente, se llevaron a cabo los siguientes tratamientos (siguiendo la metodología descrita en la sección 5.3):

- (i) *D. viscosa* + Pb (Dv+Pb)
- (ii) *D. viscosa-Cladosporium* sp sin pretratar + Pb (Dv+H+Pb)
- (iii) *D. viscosa-Cladosporium* sp pretratado electroquímicamente + Pb (Dv+H_{CE}+Pb)
- (iv) *D. viscosa-Cladosporium* sp pretratado electroquímicamente - Pb (Dv+H_{CE})

Para cada tratamiento se usaron 13 unidades experimentales, y como variables de respuesta se cuantificó el crecimiento de *D. viscosa*, concentración de plomo en tejidos, pigmentos fotosintéticos y actividad antioxidante, después de 50 días de cultivo.

5.6 Métodos analíticos

5.6.1 Viabilidad de conidios

Para determinar la viabilidad de los conidios, se inocularon 30μL (300 UFC) de una suspensión de conidios (1x10⁴ conidios/mL) con y sin pretratamiento electroquímico, en cajas Petri con medio PDA y se distribuyó en la superficie con una varilla de vidrio. Las unidades formadoras de colonias (UFC) se contaron después de 72 h de incubación a 28°C y el resultado fue expresado en porcentaje de viabilidad.

5.6.2 Crecimiento superficial y biomasa fúngica

Las mismas unidades experimentales utilizadas para la analizar la viabilidad, fueron utilizadas para calcular el crecimiento superficial y la biomasa producida después de 14 días de crecimiento (28°C, fotoperíodo de 12 h.)

Para calcular el crecimiento superficial (CS) del hongo, se obtuvieron fotos en cada condición y se analizaron con el software Image J, para conocer el área (cm²) que ocupa la biomasa del hongo en la superficie del medio PDA contenido en cajas Petri (90 x 15 mm). Este crecimiento se representó en porcentaje utilizando la siguiente ecuación:

$$CS(\%) = \frac{\text{Área de crecimiento del hongo}}{\text{Área total de la caja Petri}} * 100$$

Para el cálculo de la biomasa, se extrajo el contenido de las cajas Petri y se sumergió en 50 mL de agua destilada caliente (100°C) durante 5 min. (esta operación se realizó tres veces) para separar la biomasa del medio de cultivo. La biomasa se recuperó y se secó en una estufa (Binder BD115 3.1) durante 48 horas a 60°C. Una vez deshidratada la biomasa se registró el peso. Con los resultados obtenidos de superficie de crecimiento y el peso de

la biomasa seca, se obtuvo la densidad de la biomasa, dividiendo la biomasa (mg) sobre la superficie de crecimiento (cm²).

5.6.3 Melanina

La melanina se cuantificó a partir de la biomasa seca según el método propuesto por Beltran-Garcia *et al.*, (2014). La biomasa se sometió a una hidrólisis básica, para lo cual, en tubos de vidrio (Hach), de 16x100 mm, se agregaron 8 ml de NaOH (2M), y se colocaron en un digestor (Hach DRB200) a 100°C durante 3 h. Se separó el sobrenadante y se ajustó el pH a 2 con una solución de HCl (3M); la solución se mantuvo en reposo 12 h a 4°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 min (Eppendorf 5810R), se retiró el sobrenadante. Al precipitado se le realizó otra digestión con 8 ml HCl (6M) a 100°C por 2 h, se centrifugó a 4000 rpm por 20 min y se retiró el sobrenadante. Al precipitado obtenido se le agregó una solución de etanol-cloroformo en relación 1/10 para la purificación de la melanina. Finalmente, se extrajo el sobrenadante y el precipitado se diluyó con agua destilada para su lectura en espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu UV-1900i) a 400 nm.

5.6.4 Actividad antioxidante en *Cladosporium* sp.

La actividad antioxidante de *Cladosporium* sp. se cuantificó en la suspensión de conidios con y sin tratamiento electroquímico. Las muestras se filtraron con gasa, para separar la solución electrolítica de los conidios germinados. A la solución electrolítica se le añadió un volumen igual de acetato de etilo, y se mezcló durante 10 min, para posteriormente ser dejadas en reposo durante 5 min hasta la formación de dos fases inmiscibles. Y se separó la fase superior que contenía los antioxidantes extraídos. Por otra parte, la biomasa resultante se trituró en un mortero usando acetato de etilo (10 ml) y se filtró al vacío usando papel filtro (Whatman 40) para obtener el extracto. Los extractos tanto de la solución electrolítica como de la biomasa se combinaron y se evaporaron hasta sequedad (60°C, 48 h). El rendimiento de los extractos osciló entre 20 a 30 mg/100 ml. Los extractos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO, 100 µg/mL) y se almacenaron a 4 °C (Sheik y Chandrashekar, 2018).

La actividad antioxidante de los extractos se determinó mediante un ensayo de eliminación de radicales DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo). Para su análisis se preparó una solución de DPPH (0.135 mM) en metanol; 1 mL de esta solución se mezcló con 1 mL del extracto (Sheik y Chandrashekar, 2018). La mezcla de reacción se agitó un minuto y se dejó en la

oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. La absorbancia de la mezcla se midió en un espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu UV-1900i) a una absorbancia de 517 nm usando ácido gálico como estándar. La capacidad de inhibir el radical DPPH se calculó como:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{Abs \text{ control} - Abs \text{ extracto}}{Abs \text{ control}}$$

5.6.5 Crecimiento (*D. viscosa*)

Después de 50 días de cultivo se cuantificó el crecimiento de la planta a partir de la medición de la longitud de raíces y tallos (cm) por separado. La cuantificación de la biomasa se registró en peso seco (PS), después de deshidratar el tejido vegetal sometiéndolo a una temperatura de 60°C durante 48 h.

5.6.6 Pigmentos fotosintéticos

El contenido de carotenoides (Car), clorofila a (Cl a) y clorofila b (Cl b) se determinó por espectrofotometría (Lichtenthaler y Wellbum, 1983).

Para esto, se colocaron muestras de hojas de tejido fresco (50 mg) y se trituraron con nitrógeno líquido para realizar la extracción de los pigmentos. A las muestras trituradas se les agregó 5 mL de acetona, y posteriormente se centrifugaron a 3000 x g (15 min). La concentración de los pigmentos (Car, Cl a y Cl b) se cuantificó en el sobrenadante a 470, 645 y 662 nm, respectivamente, y se calcularon de acuerdo con las fórmulas propuestas por Lichtenthaler y Wellbum (1983).

5.6.7 pH

Se tomaron 2 g de agrolita peso fresco y se adicionaron 19 mL de agua desionizada. La agrolita se mantuvo en agitación mecánica (vórtex) durante 2 min. y se registró el pH en el sobrenadante con un potenciómetro (OAKTON pH 1100 Series).

5.6.8 Pb en raíces y tallo

El Pb se cuantificó en raíces y tallo de *D. viscosa*. Las raíces fueron previamente lavadas con una solución de EDTA (10 mM) para eliminar el Pb superficial, y posteriormente se enjuagaron con agua desionizada. Las muestras de raíces (30 mg peso secos) y tallos (100 mg peso seco) se digirieron (200°C, 15min) utilizando una mezcla de HNO₃ y agua

desionizada (5:4 v/v) en un digestor de microondas (CEM, MARSPress). Las muestras se filtraron con membranas de nylon de .45 µm (Whatman) y se adicionó agua desionizada hasta un volumen de 10 mL. El contenido de Pb en la solución se determinó por espectrometría de absorción atómica a 283 nm, por el método de flama (Shimadzu, AA-6300). El Pb se cuantificó utilizando una curva estándar de 0 a 1000 µg/mL. Con los datos obtenidos se calculó el factor de translocación (FT) con la siguiente ecuación:

$$FT = \frac{Pb \text{ en tallos}}{Pb \text{ en raíces}}$$

5.6.9 Actividad G-POX de *D. viscosa*

Para obtener el extracto enzimático crudo (EEC), se pesó biomasa fresca (PF) de raíces (50 mg) y tallos (100 mg) de cada planta. Las muestras fueron trituradas con N₂ líquido durante 4 min. Posteriormente la biomasa se resuspendió en buffer de fosfatos (50 mM, pH 7.0) con inhibidor de proteasas (5 µL/100 mg de biomasa en PF, Sigma-Aldrich P8215) utilizando una proporción de 1 mL de buffer por cada 100 mg de PF. La suspensión se centrifugó (10000 rpm, 20 min, 4°C) y el sobrenadante obtenido (EEC) se utilizó para determinar la actividad guayacol-peroxidasa (G-POX).

La actividad G-POX se determinó espectrofotométricamente en los EEC, a 415 nm, usando guayacol como sustrato reductor (Chance y Maehly. 1955). La mezcla de reacción contenía 780 µl de buffer de fosfatos de sodio (50 mM, pH 7), 40 µl de guayacol (1% preparado en buffer de fosfatos de sodio 50 mM, pH 7), 80 µL de H₂O, (10 mM preparado en buffer de fosfatos de sodio 50 mM, pH 7), y 100 µl de extracto crudo. La reacción se inició con la adición de H₂O₂ que, en el blanco, se sustituyó por buffer (50 mM, pH 7). Una unidad de actividad G-POX se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 mmol de tetraguayacol por min a 27°C.

5.7 Análisis estadístico

Para establecer diferencias significativas entre las medias de las variables analizadas se realizaron ANOVA con pruebas de Duncan y Tukey-Kramer usando el paquete estadístico NCSS. Todas las pruebas se corrieron con al menos 3 réplicas por tratamiento y las diferencias significativas entre medias se muestran con letras diferentes.

6 Resultados y discusión

6.1 Tolerancia al Pb por *D. viscosa* asociada a

Cladosporium sp.

El suelo es el medio por el cual las plantas, a través de las raíces, adquieren elementos esenciales para su desarrollo; a la vez, estas absorben elementos tóxicos incluyendo mercurio, cromo, cadmio, arsénico y plomo (Pb). La absorción de elementos tóxicos altera los procesos fisiológicos y bioquímicos en las plantas, como la fotosíntesis, la síntesis de proteínas y el equilibrio redox, ya que aceleran la generación de ERO (Aslam *et al.*, 2021). Con el fin de conocer la concentración de Pb que *D. viscosa* puede tolerar inoculada con *Cladosporium* sp., plantas de *D. viscosa* fueron trasplantadas a tubos de cultivo que contenían agrolita contaminada o no con Pb (2000 mg/kg), para posteriormente ser inoculadas con una suspensión de conidios de *Cladosporium* sp. (1×10^6 conidios/mL). Aunque antes de evaluar la tolerancia de la asociación planta-hongo, se realizaron pruebas de escarificación de semillas de *D. viscosa* para aumentar el número de plantas obtenidas.

6.1.1 Escarificación de semillas

Para mejorar la germinación y el crecimiento de las plantas de *D. viscosa*, se evaluaron tres métodos de escarificación de semillas: tratamiento térmico, sonicación y térmico con sonicación. Las semillas maduras de *D. viscosa* presentan latencia exógena, proporcionada por una cubierta impermeable al agua; misma que se puede interrumpir usando varios métodos de escarificación como: agua caliente, calor seco, incubación húmeda y cálida, almacenamiento seco a largo plazo y remojo en ácido sulfúrico concentrado. Se ha reportado que la latencia física en las semillas de seis especies de *Dodonaea* podía eliminarse sumergiendo las semillas en agua caliente (Cook *et al.*, 2008). También las ondas ultrasónicas pueden romper el período de latencia de las semillas y mejorar la vitalidad y la tasa de germinación de las semillas (Chiu, 2015).

Entre los tres tratamientos evaluados, la combinación de escarificación térmica y sonicación mostró un mayor porcentaje y vigor de germinación (Figura 5), con más de 80% de germinación de semillas y un vigor promedio de 3.6/5. El tratamiento menos efectivo resultó ser la sonicación con 27% de germinación y un vigor de germinación de 1.4/5.

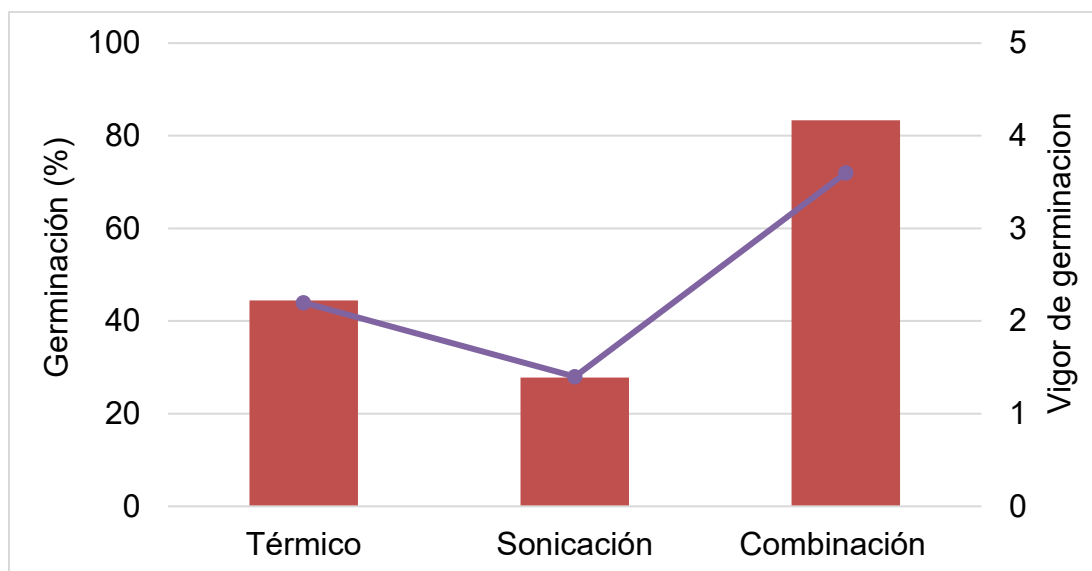


Figura 5. Porcentaje y vigor de germinación de semillas de *D. viscosa* expuestas a tres tratamientos de escarificación, después de 12 y 24 días de germinación, respectivamente (n=18). Las barras representan la germinación (%) y la línea el vigor de germinación.

Al-Namazi *et al.*, (2020), reportaron que, al sumergir semillas de *D. viscosa* en agua caliente (100°C), por 10 min, se obtuvo 90% de germinación, mientras que, en las semillas sin tratamiento se obtuvo cerca del 30%. Esto sugiere que, el aumento en la germinación se debe a que el agua caliente abre una brecha en la testa de la semilla y a través de la cual ocurre la imbibición (Baskin *et al.*, 2004). En el presente estudio, siguiendo el tratamiento únicamente con agua caliente (70°C), el porcentaje de germinación fue de 41% (Fig 13), resultado significativamente menor comparado con lo reportado por Al-Namazi *et al.*, (2020), esto puede deberse a que la temperatura del agua para la escarificación fue menor (70°C vs 100°C), así como el tiempo de exposición (3 min. vs 10 min.).

En el caso del uso de frecuencias ultrasónicas en la germinación de semillas, Zhang *et al.*, (2022), probaron el efecto de la sonicación en la germinación de semillas de maíz (*Zea mays*), y encontraron que el porcentaje de germinación después del tratamiento aumentó en un 10% comparado con las semillas sin tratamiento, y la longitud de los brotes aumentó 27%. Aunque en el presente estudio se expusieron las semillas a un tratamiento de sonicación exclusivamente, este no tuvo efecto sobre la germinación, lo cual se puede atribuir a la característica de impermeabilidad de la testa de las semillas de *D. viscosa*. Ya que la vibración mecánica generada por una onda ultrasónica puede acelerar la velocidad a la que el agua penetra en la semilla, contribuyendo a que esta salga de su estado latente, sin embargo, para que esto ocurra en este tipo de semillas se debe romper la latencia con

métodos más agresivos que eliminen la impermeabilidad o generen brechas en la testa para que ocurra la imbibición (Al-Namazi *et al.*, 2020).

No obstante, con la combinación de tratamientos, térmico y sonicación, se registró un porcentaje de más del 80% de germinación, dos veces más que el tratamiento térmico. Debido a que el tratamiento térmico y la sonicación son métodos complementarios, por una parte, el calor escarifica la semilla lo que permite que el agua entre a la semilla y comience el proceso de germinación. Después la sonicación aumenta la absorción de agua al mismo tiempo que estimula el embrión al acelerar las reacciones fisiológicas y bioquímicas (Zhang *et al.*, 2022). Qin *et al.*, (2003), mencionan que la inducción ultrasónica puede acelerar la división, el crecimiento de las células vegetales y la síntesis de proteínas de los protoplastos, que tiene un impacto en la disminución del tiempo de germinación de las semillas. En comparación con los tratamientos térmicos, la aplicación de técnicas no térmicas, como el ultrasonido, no se limita a modificar las propiedades fisicoquímicas de las semillas, ya que también se pueden lograr mejoras en los componentes nutricionales (Xia *et al.*, 2019), que se pueden reflejar en la obtención de plantas más vigorosas o de mejor calidad.

6.1.2 Tolerancia al Pb por la asociación planta-hongo

Se ha estudiado ampliamente que el exceso de Pb en el suelo puede causar efectos negativos en el desarrollo y crecimiento de plantas, debido a la toxicidad y acumulación en su biomasa vegetal (Shahabivand *et al.*, 2019; Zulfikar *et al.*, 2019). El estrés que provoca la acumulación de Pb en tejidos vegetales ha propiciado la búsqueda de nuevas estrategias para minimizar estos efectos. Por ejemplo, la inoculación de hongos septados oscuros en plantas ha demostrado beneficios, como aumento en la tolerancia a la presencia de MP, así como la estimulación sobre el crecimiento vegetal (Yang *et al.*, 2023).

Crecimiento vegetal

Se evaluó el efecto del plomo (Pb) a diferentes concentraciones (0, 1000, 2000, 3000, 4000 y 6000 mg/kg) en *D. viscosa* inoculada con un hongo del género *Cladosporium*, mediante la cuantificación de biomasa (peso seco) y la elongación de tallos y raíces, con el objetivo de determinar el índice de tolerancia (IT) y la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de Pb en la planta (Figura 6 y 7). Los datos de longitud de tallos y raíces no mostraron una tendencia definida ni diferencias significativas en comparación con el control sin Pb, por lo que solo se presentan los resultados correspondientes a la biomasa.

Como se observa en la Figura 6, el Pb tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de *D. viscosa* asociada con *Cladosporium* sp, cuando se encuentra en concentraciones por arriba de 3000 mg/kg, mostrando una disminución en el peso seco de las plantas, particularmente en raíces (36% a 3000, 43% a 4000 y 69% a 6000), en comparación con el control. Mientras que, las plantas expuestas a 2000 mg/kg presentaron un aumento de 30%, respecto a las plantas en ausencia de Pb. La biomasa de tallos presentó un aumento en las concentraciones de 1000 mg/kg (40%), mientras que para 6000 mg/kg se observó una disminución en la biomasa (42%), comparado con el control.

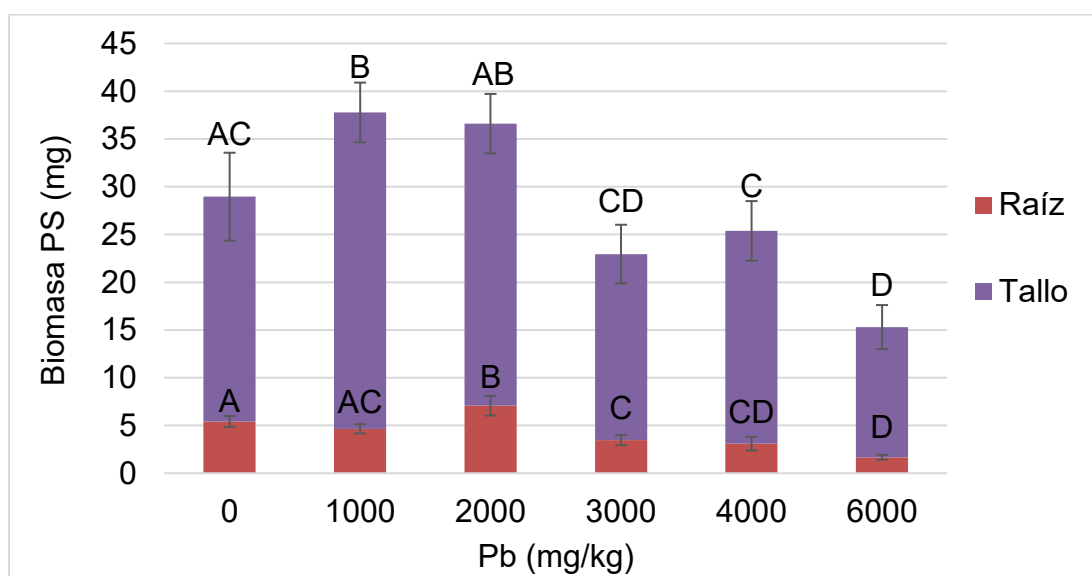


Figura 6. Biomasa de *D. viscosa* peso seco (PS) después de 40 días cultivo. Expuestas a diferentes concentraciones de Pb (0 – 6000 mg/kg) e inoculada con *Cladosporium* sp. (concentración de conidios). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$, $n=4$).

Rodriguez *et al.* (2015), evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de Pb (0, 10, 100, 500, 1000 mg/kg) en *Pisum sativum* (chícharo). Observaron una disminución en la biomasa (peso seco) de tallos y raíces con una concentración de 1000 mg/kg de Pb (42 y 68% respectivamente), siendo más susceptibles las raíces. Particularmente sobre la planta *D. viscosa*, Rojas (2014) determinó la tolerancia al Pb (0 a 3000 mg/kg), reportando que la producción de biomasa en brotes disminuyó ligeramente (8 y 16%, respectivamente), mientras que en las raíces se registró una disminución de 32 y 33%, respectivamente. La exposición de *D. viscosa* a 3000 mg Pb kg⁻¹ AS resultó fitotóxica, ya que provocó una reducción importante (55 y 73%, respectivamente) en la producción de biomasa de brotes

y raíces. Anicacio (2014), reportó un aumento de 20% en el crecimiento relativo de *D. viscosa* inoculada con *Cladosporium* sp. en presencia de Pb (2000 ppm).

Estos trabajos evidencian que la toxicidad del Pb tiene un impacto en el crecimiento de las plantas, y que la respuesta está determinada por la especie y la concentración del contaminante (Kanwal *et al.*, 2020).

Aunque las concentraciones de Pb de 1000 y 2000 mg/kg afectan negativamente el crecimiento en *D. viscosa* (Rojas-Loria *et al.*, 2014), también la presencia de ciertos microorganismos en las raíces puede proteger a la planta contra los efectos tóxicos del contaminante. En particular, en el presente trabajo se observó un aumento en la biomasa de tallos y raíces, en plantas expuestas a Pb, por la presencia del hongo *Cladosporium* sp.

Esto sugiere que la presencia del metal induce respuestas en el hongo, que favorecen el crecimiento vegetal, puesto que, en las plantas que fueron inoculadas con el hongo, pero en ausencia del metal, se registró un peso menor. Esta respuesta podría estar relacionada con una estimulación la actividad metabólica del hongo, como lo menciona Qiu *et al.*, (2021), quienes asumen que la exposición a Pb^{2+} (0.893 mmol/L) estimula la actividad microbiana al promover el ciclo TCA de *Aspergillus niger*. En *Cladosporium* sp. podría estar ocurriendo algo similar, es decir, que la presencia de Pb induce cambios en el metabolismo de este hongo que impactan en su asociación con *D. viscosa* de manera positiva.

Índice de tolerancia (IT) y concentración inhibitoria media (CI₅₀)

En las plantas, las raíces son más susceptibles a los efectos tóxicos causados por la exposición a Pb que otros órganos de las plantas, ya que, estas están en contacto directo con el contaminante. Por esta razón, y por los resultados obtenidos de biomasa de tallos y raíces, se seleccionó el peso seco de raíces como la variable de respuesta para estimar el IT y la CI₅₀ (Fig. 7). Encontrando que el IT muestra una tendencia a disminuir a medida que aumenta la concentración de Pb en el soporte, no obstante, a la concentración de 2000 mg/kg se presenta un valor que no sigue la tendencia, aumentando el IT 15% en comparación con el control. La CI₅₀ resultó ser de aproximadamente 3987 mg/kg de Pb.

En estudios previos se ha reportado en *D. viscosa*, una CI₅₀ de 2797 mg/kg de Pb, bajo condiciones *in vitro*, y agrolita como soporte modelo (Rojas-Loria *et al.*, 2014). Sin embargo, en el presente estudio, cuando la planta fue inoculada con el hongo *Cladosporium* sp. (1×10^6 UFC/mL) bajo condiciones de cultivo similares, se registró una CI₅₀ mayor (≈ 4000 mg/kg), lo que indica un aumento en la tolerancia al Pb por efecto del hongo. Esto

concuerta con lo reportado por diversos autores, que mencionan que la presencia de microorganismos en la rizosfera mejora la tolerancia a MP (Timmusk *et al.*, 2017; He *et al.*, 2020; Manoj *et al.*, 2020; Khalid *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2022). En cuanto a las interacciones endofíticas, estas incluyen beneficios como, un mejor crecimiento de las plantas, mayor contenido de nutrientes, resistencia o tolerancia a enfermedades y mayor tolerancia a estrés por metales pesados (Uzma *et al.*, 2019). Ejemplo de esto, son los trabajos realizados por Bilal *et al.*, (2019), donde evalúan la co-inoculación de *Paecilomyces formosus* LHL10 y *Penicillium funiculosum* LHL06, en soja (*Glycine max*) expuesta a distintos metales pesados (Ni, Cd y Al); encontrando que, la inoculación con ambos hongos promovió el crecimiento de las plantas; no obstante, la inoculación con LHL06 mostró capacidad para promover el crecimiento y la tolerancia vegetal, así como una reducción en la acumulación de metales.

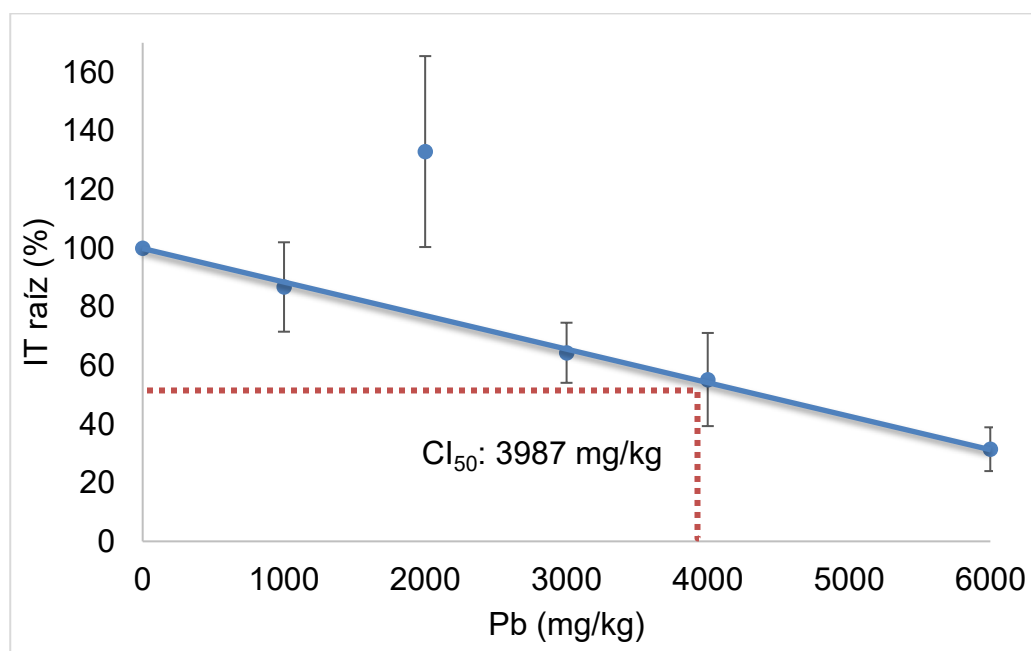


Figura 7. Índice de tolerancia (IT) de *D. viscosa* expuesta a diferentes concentraciones de Pb (0-6000 mg/kg) después de 40 días de cultivo. El IT se estimó con datos de la biomasa de la raíz (en base seca). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$, $n=4$).

Como indican los resultados obtenidos de biomasa y tolerancia al Pb, el hongo *Cladosporium* sp. tiene un impacto positivo en *D. viscosa* en presencia del metal, ya que aumentó la tolerancia al contaminante, e incluso se aprecia un efecto estimulante que se refleja en un mayor crecimiento de las plantas expuestas a las concentraciones de 1000 y 2000 mg/kg. Si bien, la planta mostró una alta tolerancia al Pb con la inoculación del hongo

(CI50=3987 mg/kg de Pb), se seleccionó la concentración de Pb de 2000 mg/kg para las pruebas posteriores por dos razones principales:

1. Las plantas inoculadas obtuvieron un aumento de biomasa en raíces, lo cual es de gran importancia considerando que la raíz es el órgano más expuesto a la condición de estrés.
2. A concentraciones de Pb superiores a 2000 mg/kg, la colonización del hongo en el soporte (agrolita) disminuye, lo que indica un efecto tóxico para el microorganismo a concentraciones mayores a 3000 mg/kg.

6.2 Pretratamiento electroquímico

6.2.1 Condiciones de operación del reactor electroquímico

La caracterización del reactor electroquímico se realizó bajo condiciones abióticas para establecer los parámetros de operación, con el fin de identificar cambios drásticos de temperatura o pH de que pudieran inhibir el crecimiento del hongo. Los valores de operación de la celda se establecieron aplicando diferentes intensidades de corriente (5 – 500 mA) entre los electrodos y la solución electrolítica (0.1 M:KH₂PO₄), registrando un potencial de celda entre 1.5 – 15 V, como se observa en la Figura 8.

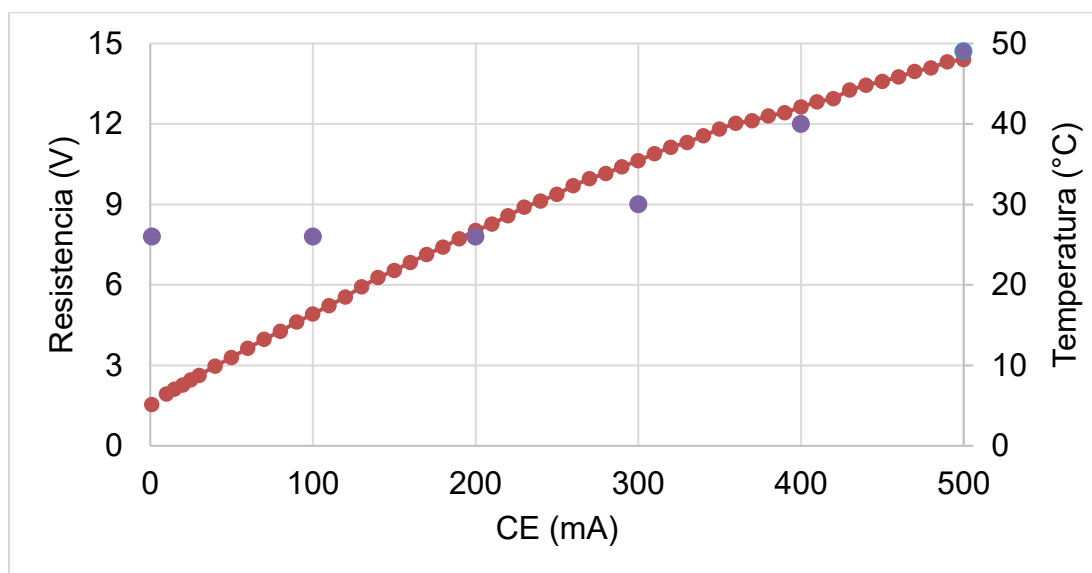


Figura 8. Caracterización del reactor electroquímico en condiciones abióticas utilizando solución electroquímica (0.1 M:KH₂PO₄). Registro del potencial de celda (V), puntos rojos, y temperatura (°C), puntos azules, en función de la intensidad de corriente eléctrica impuesta (mA).

Como se observa en el voltamperograma (Figura 8), el potencial de celda (V) aumenta linealmente con la intensidad de la corriente, indicando un comportamiento igual al de una resistencia eléctrica. Bajo este supuesto, el campo eléctrico actúa solo como un factor de estrés abiótico, provocando modificaciones fisiológicas en el microorganismo.

Por otro lado, los datos registrados de temperatura y pH durante la aplicación de la corriente muestran ligeras modificaciones en el sistema. Al inicio del tratamiento, el pH se mantuvo constante (5.7), sin embargo, a partir de 30 mA se observó una disminución (4.8), alcanzando un valor final de 4.2 al aplicar 500 mA. En cuanto a la temperatura, esta comenzó a aumentar por arriba de 350 mA, alcanzando una temperatura de 34°C, llegando a un máximo de 49°C al aplicar 500 mA. Este aumento de temperatura afecta el metabolismo del hongo disminuyendo su actividad metabólica, puesto que la temperatura óptima para el crecimiento de este microorganismo es de 28°C.

Por esta razón se consideró que el intervalo de selección de la intensidad de corriente para los tratamientos fuera entre 5–100 mA que corresponde a un potencial de celda de 1.5 y 5 V. Seleccionando 0, 10, 30, 50 y 100 mA, (0, 2, 2.5, 3.3 y 5 V, respectivamente) durante 12 horas para el pretratamiento a los conidios de *Cladosporium* sp.

6.2.2 Germinación de los conidios y efecto de la CE en el crecimiento de *Cladosporium* sp.

Con el objetivo de inducir un estímulo sobre *Cladosporium* sp., se aplicaron 4 intensidades de corriente eléctrica, como un factor de estrés. La exposición a la CE fue durante la etapa de germinación del hongo, utilizando electrodos de titanio recubiertos con óxido de rutenio colocados dentro de un reactor electroquímico.

En la Figura 9 se presentan los porcentajes de germinación, mostrando que, tras 20 h de cultivo, más del 90% de los conidios habían germinado. Considerando un conidio germinado cuando el tubo germinativo fue igual o mayor al diámetro de este (Safavi *et al.*, 2007).

Sin embargo, los conidios recién germinados (20 h) pueden ser vulnerables a los efectos negativos del estrés. Puesto que, se ha demostrado que la corriente eléctrica puede resultar letal en esporas recién producidas como reportan Velasco-Alvarez *et al.* (2011), quienes

tras varias pruebas encuentran que el momento más indicado para aplicar la corriente eléctrica es cuando ha finalizado la etapa de germinación de las esporas.

Por esta razón, se estableció la aplicación de la CE a las 72 h de germinación, permitiendo así el desarrollo de la hifa y asegurando que los conidios germinados tuvieran una mayor resistencia al estrés inducido.

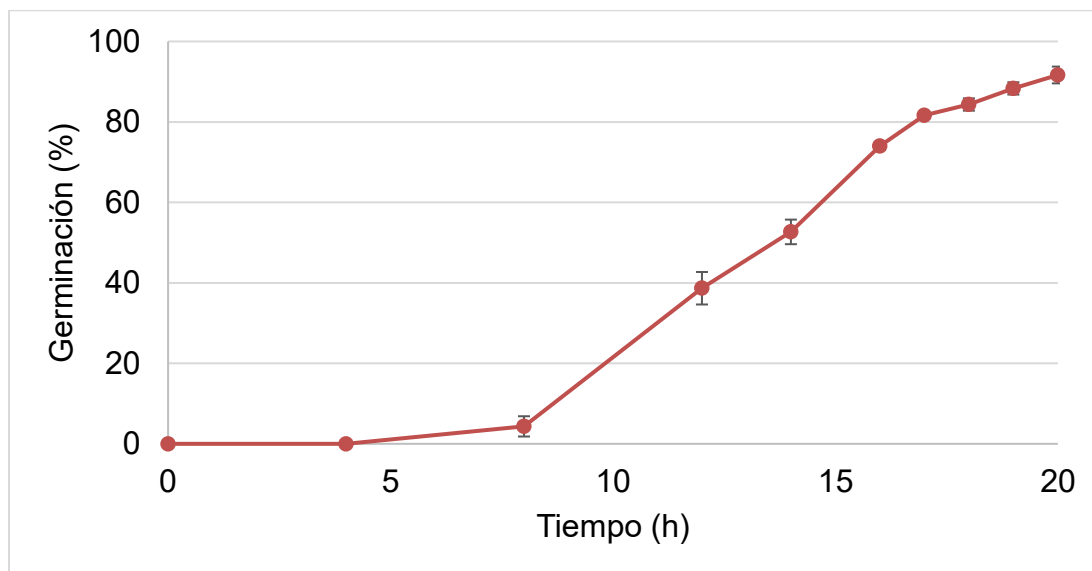


Figura 9. Porcentaje de germinación de los conidios de *Cladosporium* sp. durante 20 h.

Una vez seleccionadas las intensidades de corriente eléctrica (0, 10, 30, 50 y 100 mA; 12 h) y el tiempo de germinación (72 h), se evaluó el efecto de la CE sobre el crecimiento del hongo. Para evaluar el efecto del tratamiento se inocularon cajas Petri con medio PDA con la suspensión de los conidios tratados con CE, cuantificando, la viabilidad, el crecimiento superficial y la biomasa del hongo.

Viabilidad

La viabilidad en hongos conidiales, se refiere a la capacidad que presentan los conidios para germinar y dar origen a una colonia visible. Esta puede verse afectada por condiciones ambientales desfavorables, como la generación de ERO, lo que podría reducir la germinación o limitar su crecimiento.

En la figura 10 se muestra que la viabilidad de los conidios disminuyó al aumentar la intensidad de CE. La aplicación de 10 y 30 mA provocó una pérdida de viabilidad cercana a 25%, para 50 mA se observó una disminución de más de 85%, y para 100 mA el resultado fue letal, presentando una inhibición total en el crecimiento fúngico.

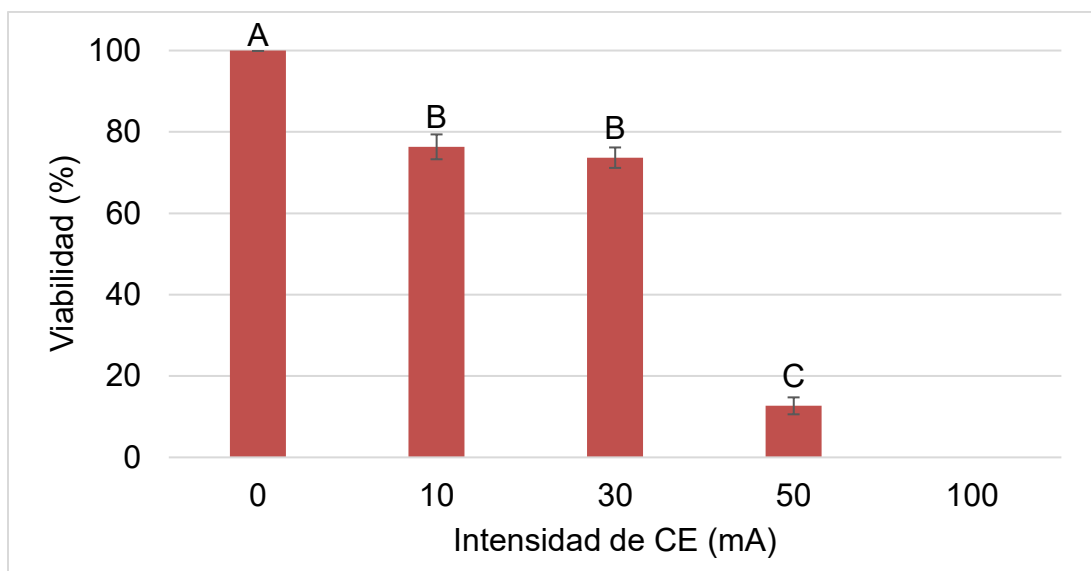


Figura 10. Porcentaje de viabilidad en esporas de *Cladosporium* sp. después de 72 h de cultivo y expuestas a diferentes intensidades de CE (12 horas). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$, $n=3$).

Diversos estudios reportan que intensidades elevadas tienen un efecto inhibitorio sobre microorganismos. La mayoría se enfocan en bacterias y en el potencial de la CE para inactivar o eliminar microorganismos. Por ejemplo, Park *et al.* (2003), mostraron que la aplicación de una intensidad de CE de 1 A causa daños irreversibles en células bacterianas. Diao *et al.* (2004), encontraron un efecto negativo sobre *Escherichia coli.*, al aplicar una intensidad de 320 mA (2 min), observando la mortalidad del 99.8%. No obstante, también se han reportados efectos similares en otros microorganismos cuando se aplican intensidades de corriente más bajas con un propósito distinto a la inactivación microbiana. Tal como reportan Hosseini *et al.* (2014), en *Fusarium oxysporum* al ser expuesto a 10mA, se presentó una disminución del 30% en su crecimiento, en comparación con el control. Rodríguez-Gómez *et al.* (2020), encontraron que en el hongo *Metarhizium anisopliae* se redujo la viabilidad de los conidios un 20% al aplicar una CE (1.3 mA) respecto al control. Estos reportes coinciden con lo descrito en el presente trabajo, que incluso a intensidades moderadas de CE existe un impacto sobre la viabilidad de los microorganismos.

El impacto negativo de la CE sobre la viabilidad de los microorganismos puede no deberse *per se* a la acción de la CE, sino más bien, a efectos que se pueden presentar durante la aplicación del campo eléctrico; estos efectos dependen del medio al que se le esté aplicando la CE, por ejemplo, la resistencia que presente el medio, aumento de la temperatura por la pérdida óhmica, variaciones en el pH, o producción de moléculas tóxicas

(ERO) debido a las reacciones electroquímicas, son algunos de los factores que pueden afectar la viabilidad. Sin embargo, en el reactor electroquímico no se presentaron modificaciones de temperatura a las intensidades de CE probadas, y los cambios de pH (5.7 a 4.8) no se encuentran en una magnitud que puedan influir en la viabilidad del hongo, ya que se ha registrado que los hongos pueden crecer óptimamente en ambientes con valores de pH entre 4 y 6 (Vázquez-García *et al.*, 2002). Por lo tanto, la disminución en la viabilidad por efecto de la CE podría atribuirse a los productos de la electrolisis del agua que conducen a la producción de ERO, como H_2O_2 , que es un compuesto altamente dañino para los microorganismos (She *et al.*, 2006).

Crecimiento superficial

El crecimiento de los conidios de *Cladosporium* sp. inoculadas en cajas Petri con PDA (después de la exposición a la CE), se cuantificó mediante la medición del área superficial de las colonias, mostrando un efecto negativo de la CE (Fig. 11).

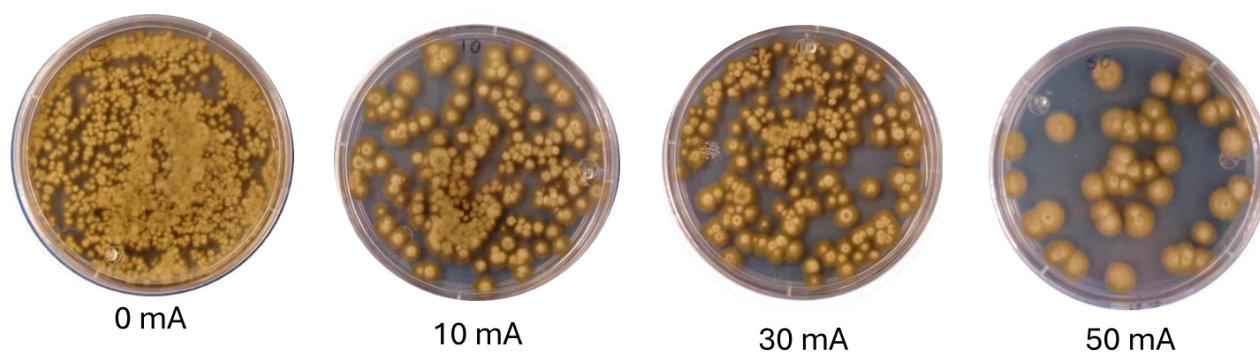


Figura 11. Crecimiento de *Cladosporium* sp. en cajas Petri con medio PDA, después de aplicar diferentes intensidades de CE (72 h, después de la germinación de los conidios).

El porcentaje de superficie colonizada por el hongo mostró una tendencia a disminuir con el aumento de intensidad de CE (Fig. 12). En el control (sin CE) se obtuvo un 87% de colonización de la superficie total de la caja (63 cm^2) en 14 días, mientras que, al aplicar intensidades de CE de 10, 30 y 50 mA, se observó un porcentaje de colonización de 58, 48 y 31, respectivamente.

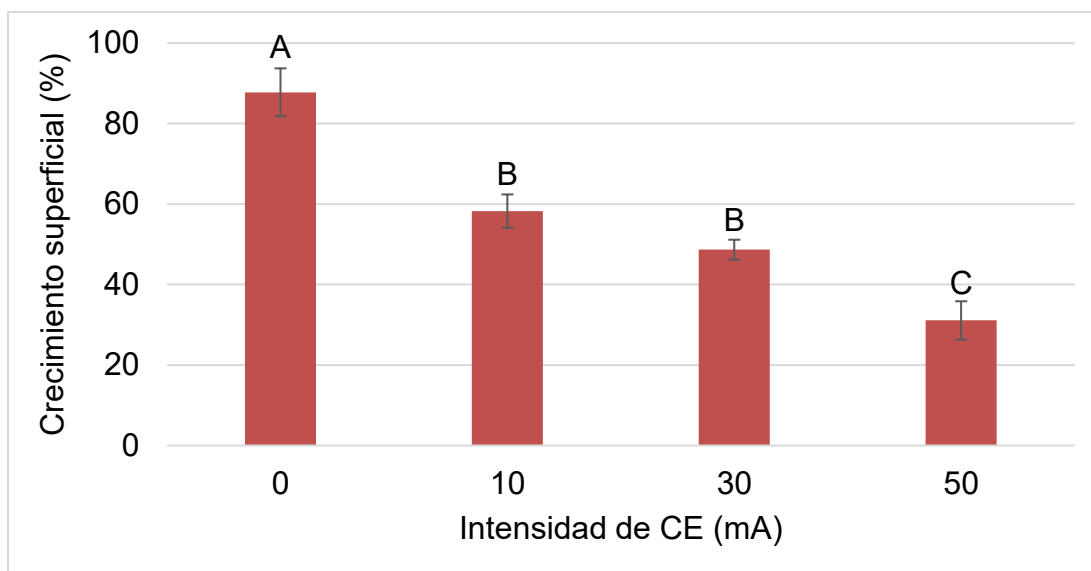


Figura 12. Crecimiento superficial de *Cladosporium* sp. expuesto a distintas intensidades de CE, con 14 días de crecimiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$, $n=3$).

Las causas de la disminución del crecimiento microbiano por acción de una CE son complejas y están relacionadas con el tipo de microorganismo, el medio y los materiales usados en los electrodos (Valle *et al.*, 2007). Hosseini *et al.*, (2014), probaron el efecto de la CE (electrodos de platino, medio mGY, 10 mA) sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, encontraron que la producción de micelio y esporas disminuye y las esporas producidas fueron de mayor tamaño, respecto al control en donde hubo mayor producción de micelio de esporas.

Este comportamiento puede deberse a la formación de ERO debido a las reacciones de electrólisis del agua. Ya que, se ha estudiado el efecto de las ERO sobre el crecimiento de hongos filamentosos, encontrando que la presencia de H_2O_2 , conduce a una disminución del crecimiento de hifas (Kreiner *et al.*, 2003).

Biomasa

Después de aplicar la CE en los conidios, se observó una tendencia inversa al crecimiento superficial, es decir, la densidad de la biomasa fue mayor conforme aumentó la intensidad (Fig. 13). La densidad de la biomasa se obtuvo dividiendo el peso fresco (PF) de la biomasa obtenida en cada caja Petri entre la superficie colonizada (mg/cm^2).

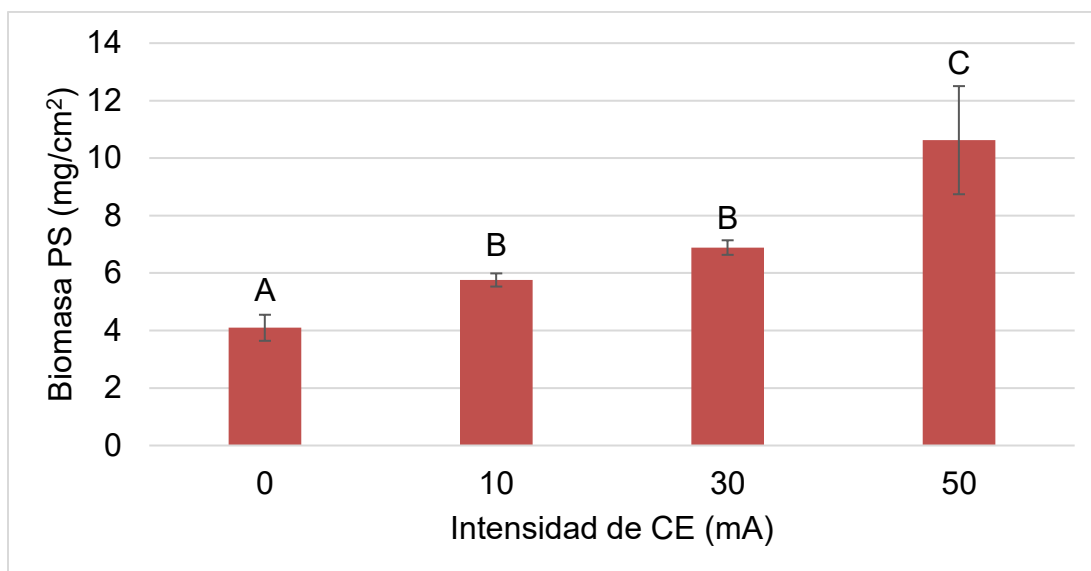


Figura 13. Densidad de biomasa de *Cladosporium* sp. expuesto a distintas intensidades de CE después de 14 días de cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$, $n=3$).

La mayor densidad en la biomasa (10.6 mg/cm^2) se presentó con el pretratamiento con 50 mA, mientras que, para 10 y 30 mA se registró una densidad de 5.7 y 6.8 mg/cm^2 respectivamente, mostrando una diferencia estadísticamente significativa para 30 y 50 mA, respecto al control (4.1 mg/cm^2). Esto indica, que la CE puede inducir modificaciones en el hongo, con posibles impactos en la morfología y el metabolismo del hongo como respuesta al estrés generado.

En general, la exposición de microorganismos a una CE tiene efectos negativos sobre el crecimiento (Kim *et al.*, 2010, Krol y Jarmoluk 2014, Ailijiang *et al.*, 2016). Por ejemplo, Velasco-Alvarez *et al.*, (2011), observaron que, al aplicar una corriente de 8 mA durante 24 horas, en micelio de *Aspergillus niger*, se presentó una disminución en el crecimiento del hongo, respecto al control.

Existe evidencia de que el estrés oxidante provocado por una CE puede presentar efectos notorios sobre la morfología de los hongos filamentosos (Velasco-Alvarez *et al.*, 2017, Hosseini *et al.*, 2014). Asimismo, se ha reportado que, en ambientes ricos en oxígeno la longitud de las hifas disminuye y aumenta la ramificación (Bai *et al.*, 2004), lo que explica por qué se produce una gran cantidad de biomasa en un área de superficie pequeña. Estos cambios en la morfología también pueden impactar en el aumento de la tolerancia a ambientes estresantes, al reducir la superficie expuesta a agentes inductores de estrés.

6.2.3 Efecto de la CE sobre mecanismos de defensa en *Cladosporium* sp.

Cuando los microorganismos son expuestos a cambios en su entorno, provocando algún tipo de estrés, estos, generalmente activan mecanismos de respuesta, es decir, son capaces de adaptarse al nuevo entorno aumentando su tolerancia al estrés; incluso en algunos casos, se ha observado que el estrés puede estimular el crecimiento (Tan *et al.*, 2022).

Los hongos septados oscuros exhiben mecanismos de defensa en respuesta al estrés, que incluyen modificaciones morfológicas, mayor generación de pigmentos como la melanina, así como un aumento en la producción de enzimas antioxidantes y antioxidantes no enzimáticos como mecanismos de defensa (Ban *et al.*, 2023).

Melanina

En el presente estudio, se encontró que la aplicación de CE sobre conidios de *Cladosporium* sp., aumentó la producción de melanina (Fig. 14), cuantificando concentraciones mayores a 3 mg por g de biomasa seca (BS). Aunque, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, si se observó una diferencia entre 10 mA (3.5 mg/g de BS) y el control (2.6 mg/g de BS). Este resultado nos indica que una baja intensidad de CE es suficiente para estimular la producción de melanina y al mismo tiempo, causar un efecto positivo para contrarrestar el efecto de estrés al que son sometidos los organismos.

La inducción de estrés puede aumentar la producción de melanina como un mecanismo de defensa en los DSE. En un estudio realizado con hongos aislados de suelos con altos niveles de radiación, como *Purpureocillium lilacinum*, se encontró que el contenido de melanina fue entre 2 y 2.5 veces más, respecto a cepas aisladas de áreas libres de radiación (Gessler *et al.*, 2014). Por otro lado, Zhan *et al.*, (2011) demostraron en un hongo septado oscuro *Exophiala pisciphila*, como aumentaba la producción de melanina (9 a 12 mg/g de biomasa seca), conforme aumentaba la concentración de Cd (II) de 50–350 mg L⁻¹, respectivamente. Otros estudios como los realizados por Ban *et al.*, (2023), encontraron un incremento en el contenido de melanina (350 %, por arriba del control) en *Exophiala salmonis*, cuando fue expuesto a una concentración de 250 mg/L de nanopartículas de óxido de cobre (II) CuO.

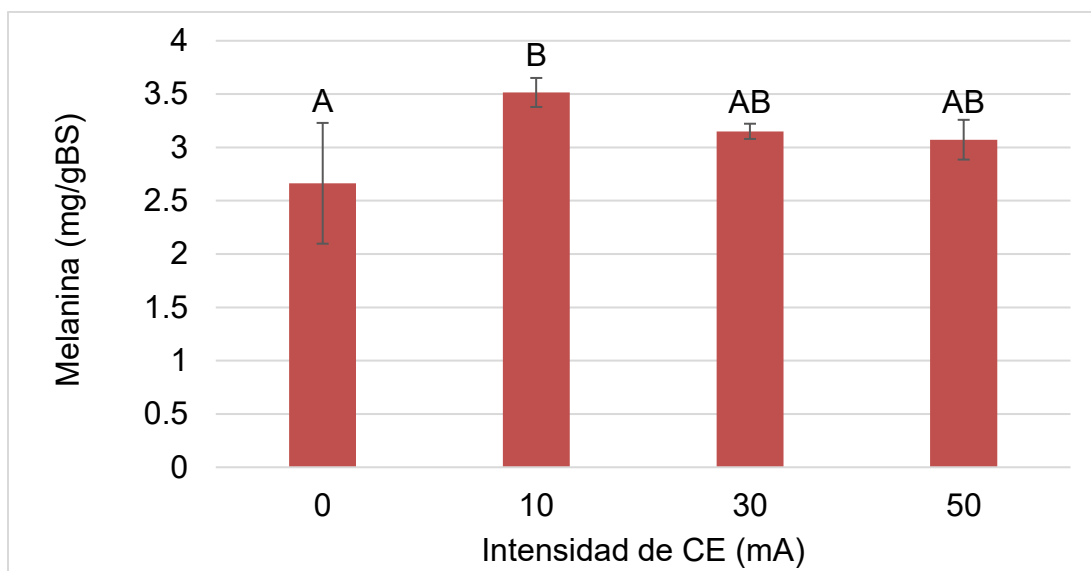


Figura 14. Contenido de melanina en la biomasa de *Cladosporium* sp. expuesto a distintas intensidades de CE, después de 14 días. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$, $n=3$).

El aumento en la producción de melanina en organismos expuestos a estrés es una respuesta esperada, ya que la melanina confiere tolerancia a ambientes desfavorables, estos ambientes estresantes conducen a la inducción de estrés oxidante. Suárez-Vergel *et al.*, (2021), en cepas de *Cordyceps fumosorosea* CHE-CNRCB 303 y *Cordyceps javanica* ARSEF 3302, demostraron que la melanina producida por estos hongos presentó actividad antioxidante, además, los conidios melanizados presentaron una mayor termotolerancia y resistencia a radiación UV-B que los conidios no melanizados. También Suthar *et al.*, (2023), sugieren que la melanina producida por hongos ascomicetos como *C. neoformans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus bridgeri* y *A. alternata* presentan una potente actividad antioxidante

Esto indica que la melanina es importante en la eliminación de ERO y en la protección contra el estrés oxidante en muchas especies de hongos.

Actividad antioxidante

La respuesta del hongo a la CE (0, 10, 30 y 50 mA; 12 h), concerniente a la producción de moléculas antioxidantes, se evaluó mediante la capacidad de neutralización del radical DPPH intra (conidios germinados) y extracelularmente (solución electrolítica), en los extractos obtenidos.

Los resultados obtenidos (Fig. 15) muestran que la exposición a una intensidad de CE de 10 mA promovió la producción de compuestos antioxidantes al presentar el mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH ($34\% \pm 1.2$), mientras que intensidades de 30 y 50 mA, el porcentaje de inhibición fue menor ($27\% \pm 0.4$) en comparación con el control sin CE ($30\% \pm 0.6$).

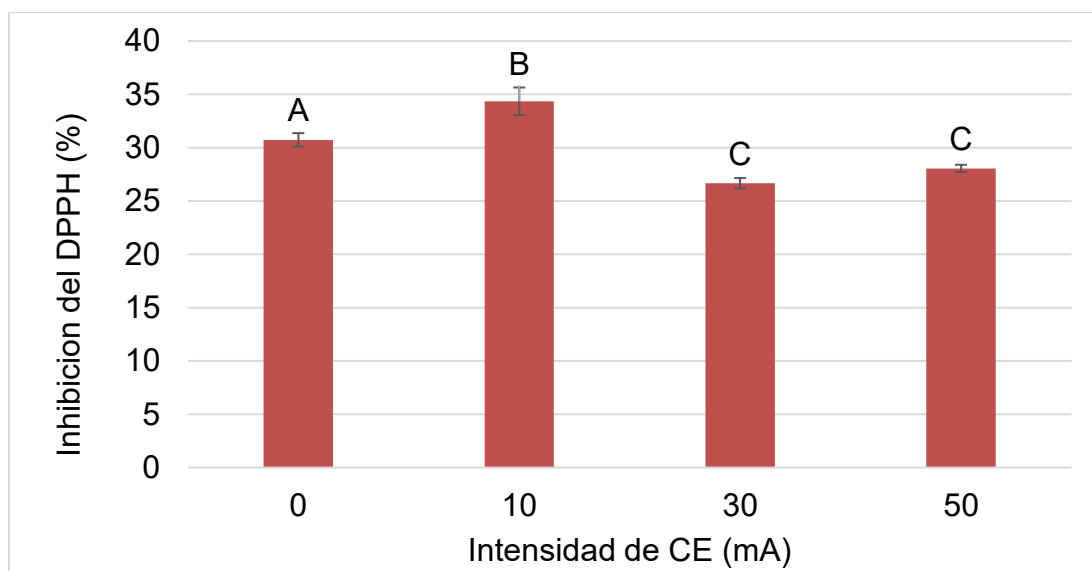


Figura 15. Actividad antioxidante de *Cladosporium* sp. expuesto a distintas intensidades de CE durante 12h. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$, $n=3$).

Zhang *et al.* (2011) evaluaron la actividad antioxidante en *Exophiala pisciphila*, reportando que, a una concentración de extracto de 100 $\mu\text{g/ml}$ de antioxidantes, el porcentaje de inhibición del radical fue menor a 20%. En el presente trabajo el porcentaje de inhibición en todos los tratamientos fue mayor a 20%, alcanzado un valor máximo de 34% (10 mA), mostrando una mejor capacidad de inhibición del DPPH por *Cladosporium* sp. independientemente del tratamiento aplicado.

Sheik y Chandrashekar (2018), probaron la capacidad antioxidante de distintos hongos endófitos mediante el ensayo de neutralización de DPPH, entre los hongos evaluados *Curvularia pallescens* y *Hypoxyton anthochroum* mostraron la mayor capacidad antioxidante; encontrando porcentajes de inhibición del DPPH de 66.5 y 49.5 %, respectivamente, mientras que *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata* presentaron los porcentajes de inhibición más bajos con 7.4 y 17.6 %, respectivamente. Estos valores evidencian que el contenido de compuestos antioxidantes en los hongos varía dependiendo de la especie.

Los resultados obtenidos en esta etapa indican que la CE influye en las variables relacionadas con la viabilidad y crecimiento de *Cladosporium* sp., también en las variables relacionadas con mecanismos de defensa contra estrés. Es decir, la aplicación de una baja intensidad de CE (10 mA) provoca efectos positivos, especialmente en los mecanismos de defensa (producción de melanina y compuestos antioxidantes). Esto concuerda con lo reportado por Beretta *et al.*, (2019) quienes mencionan que la aplicación de CE con intensidades cercanas a 10 mA en microorganismos causa efectos estimulantes. Por lo tanto, para evaluar el efecto de *Cladosporium* sp. pretratado, inoculado en *D. viscosa* expuesta a Pb, se eligió una intensidad de 10 mA durante 12h sobre los conidios germinados, como factor de estrés.

6.3 Efecto de *Cladosporium* sp. pretratado sobre la tolerancia al Pb en *D. viscosa*

La exposición de las plantas a niveles tóxicos de MP desencadena una amplia gama de alteraciones fisiológicas y metabólicas. Sin embargo, como los MP tienen diferentes sitios de acción dentro de la planta, la respuesta tóxica difiere entre ellas. El efecto de toxicidad por MP se refleja en una disminución en el crecimiento de la planta que incluye: clorosis de las hojas, necrosis, pérdida de turgencia, disminución en la tasa de germinación de semillas y un aparato fotosintético paralizado, a menudo correlacionado con procesos de senescencia progresivos o con la muerte de la planta (Kumar *et al.*, 2020).

Para superar el daño causado por la toxicidad del Pb, las plantas presentan mecanismos de defensa, que en términos de biorremediación se consideran poco eficientes. Por lo que se han implementado técnicas para conferir resistencia o aumentar la tolerancia en ambientes contaminados con MP (Aslam *et al.*, 2021) como el uso de microorganismos modificados que reducen la toxicidad de los elementos tóxicos y que podrían conferir resistencia a las especies vegetales (Padhan *et al.*, 2021).

Para evaluar el efecto del hongo pretratado con CE sobre la tolerancia al Pb (2000 mg/kg), en asociación con *D. viscosa*, se cuantificó el crecimiento (biomasa y longitud), la acumulación de Pb en los tejidos, el contenido de pigmentos fotosintéticos y la actividad de la enzima G-POX. Estas variables fueron analizadas bajo cuatro diferentes condiciones: i) *D. viscosa* expuesta a Pb sin inóculo (Dv+Pb), ii) *D. viscosa* expuesta a Pb e inoculadas con el hongo sin pretratamiento con CE (Dv+H+Pb), iii) *D. viscosa* expuesta a Pb e

inoculadas con el hongo pretratado con CE (Dv+H_{CE}+Pb), y iv) *D. viscosa* inoculada con el hongo pretratado con CE y sin Pb (Dv+H_{CE})

6.3.1 Crecimiento

Los cambios morfológicos en la planta sirven como un indicador visual de estrés en las plantas y pueden proporcionar información valiosa sobre la toxicidad de la contaminación por Pb en el medio ambiente (Soltabayeva *et al.*, 2021). Como se observa en la Figura 16, las plantas no mostraron síntomas de toxicidad, como enrollamiento de las hojas, clorosis y necrosis; esto corrobora que esta especie exhibe cierta tolerancia a este contaminante. Las plantas en condiciones Dv+H_{CE}+Pb y Dv+H_{CE}, presentaron una mejor apariencia, de manera contraria, las plantas en la condición Dv+Pb tenían un aspecto más desfavorable, reflejando el efecto benéfico de la inoculación en la planta por la presencia del Pb.

El crecimiento de *D. viscosa*, en términos de longitud, no muestra diferencias significativas en las condiciones probadas, por lo tanto, los datos obtenidos no son mostrados.

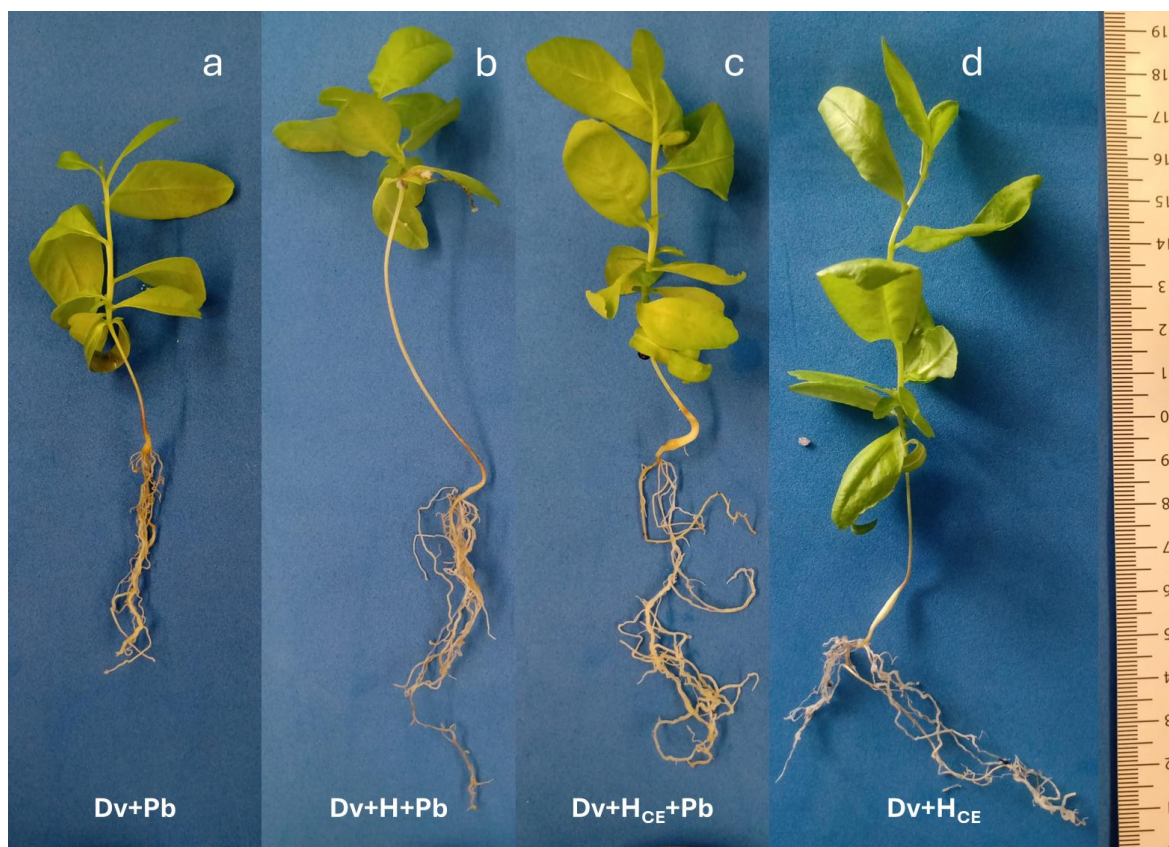


Figura 16. Crecimiento de *D. viscosa* después de 50 días de cultivo, en las diferentes condiciones analizadas. a) **Dv+Pb:** Planta con Pb; b) **Dv+H+Pb:** Planta y hongo, con Pb; c) **Dv+H_{CE}+Pb:** Planta y hongo pretratado (CE), con Pb; d) **Dv+H_{CE}:** Planta y hongo pretratado (CE), sin Pb.

Respecto a la biomasa, los resultados indican que la inoculación con *Cladosporium* sp. pretratado mejora el crecimiento de la planta (Fig. 17). Particularmente, los tallos de las plantas inoculadas con el hongo pretratado (Dv+H_{CE}+Pb y Dv+H_{CE}), presentaron un mayor crecimiento hasta (2.36 veces más), respecto a los tratamientos en ausencia del hongo pretratado (Dv+Pb, Dv+H+Pb). En cuanto a la biomasa de raíces, el tratamiento que mostró diferencias significativas respecto de *D. viscosa* con Pb, fue el tratamiento Dv+H_{CE}+Pb, con una biomasa 2.3 veces mayor.

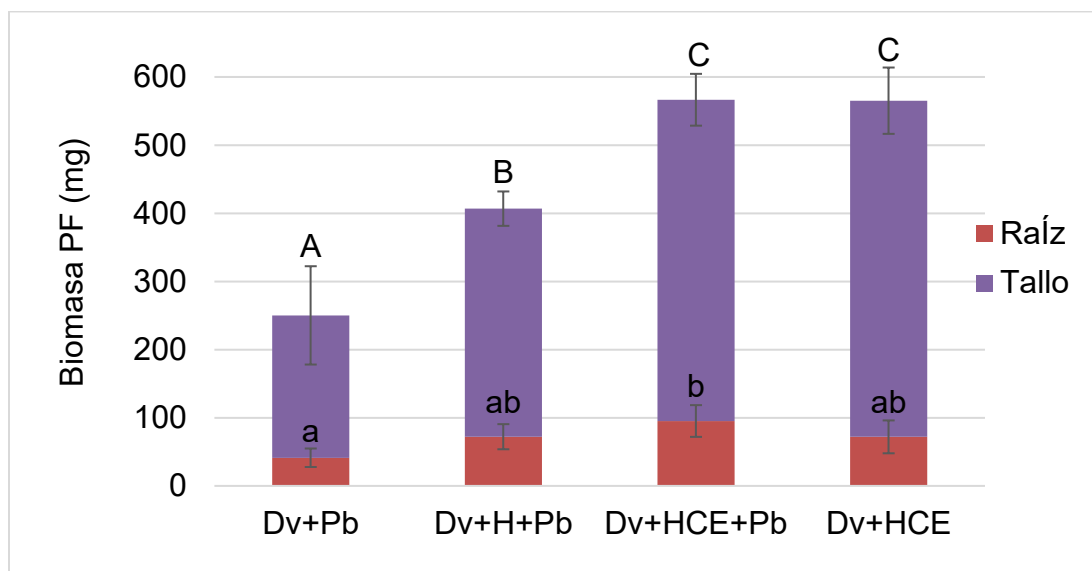


Figura 17. Biomasa (PF: peso fresco) de *D. viscosa* en las diferentes condiciones analizadas, después de 50 días de cultivo (25°C fotoperiodo de 12 h.). **Dv+Pb:** Planta con Pb; **Dv+H+Pb:** Planta y hongo, con Pb; **Dv+H_{CE}+Pb:** Planta y hongo pretratado (CE), con Pb; **Dv+H_{CE}:** Planta y hongo pretratado (CE), sin Pb. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$, $n=4$).

Cuando *D. viscosa* está asociada con el hongo sin tratar y en presencia de Pb, también se observó una respuesta positiva, ya que, el tallo y las raíces crecieron entre un 60 y 75 % más que en las plantas solo con el Pb. Esta respuesta es similar a lo observado por Anicacio (2014), quienes reportan un aumento en el crecimiento del 70%, en plantas de *D. viscosa* asociadas con un hongo del género *Cladosporium* y una concentración de Pb de 2000 mg/kg, respecto a las plantas sin inóculo.

Otro estudio referente al impacto de inóculos fúngicos en especies vegetales en presencia de MP es el de Quan *et al.*, (2023), en el cual, se evaluó el impacto de la inoculación de dos especies de *Laccaria* en plantas de *Pinnus densiflora*, observando un aumento significativo en el crecimiento de las plántulas en presencia de 600 mg/kg de Cd y Cu.

En lo que respecta a la asociación entre hongos y plantas, hasta el momento, hay pocos reportes que indiquen el efecto de inóculos pretratado electroquímicamente en plantas cultivadas en suelos contaminados con MP, lo que resalta la novedad del presente estudio. Los resultados obtenidos en *D. viscosa* sugieren que el pretratamiento con CE aplicado al hongo *Cladosporium* sp., indujo modificaciones en el microorganismo que impactaron de manera benéfica en el crecimiento de *D. viscosa*, bajo condiciones de estrés por Pb.

Por ejemplo, *Cladosporium* sp. puede estar estabilizando el Pb en el soporte (agrolita) disminuyendo su toxicidad o su paso hacia los tejidos aéreos de la planta. Lo anterior puede atribuirse a que, los hongos de este género se caracterizan por la presencia de melaninas en su pared celular, las cuales tienen la capacidad de atrapar una amplia gama de elementos o compuestos tóxicos, incluidos los MP. Esta hipótesis podría ser respaldada por la respuesta observada en las raíces de las plantas expuestas al inóculo, las cuales muestran una mayor producción de biomasa en comparación con las plantas expuestas al Pb sin inocular. Es sabido que el Pb causa inhibición en la producción de la raíz, debido a la acumulación tóxica de Pb, misma que interfiere con la formación de husos mitóticos y el crecimiento de las paredes celulares, disminuyendo la expansión y división celular (Kanwal *et al.*, 2020).

Por otra parte, en las plantas inoculadas con el hongo pretratado (Dv+H_{CE}+Pb y Dv+H_{CE}), se obtuvo el mejor crecimiento. Esta respuesta podría estar relacionada con la capacidad que tienen ciertos hongos endófitos del género *Cladosporium* para producción de fitohormonas, pues se ha reportado que producen ácido indol-3-acético (Yang *et al.*, 2023). En este sentido se sugiere que la CE probablemente indujo un estímulo en el hongo, mejorando su actividad promotora de crecimiento vegetal.

6.3.2 Pigmentos fotosintéticos y respuesta antioxidante

Junto con otros metales, el Pb disminuye la eficiencia fisiológica de las plantas, ya que la exposición a MP afecta desfavorablemente la concentración de pigmentos fotosintéticos y la actividad de enzimas antioxidantes (Ahmad *et al.*, 2023). Se ha reportado que la disminución en la capacidad fotosintética es uno de los síntomas más reconocidos en plantas expuestas a niveles tóxicos de Pb (Liu *et al.*, 2018).

En la Figura 18, se presentan los resultados del contenido de pigmentos fotosintéticos en *D. viscosa* en las distintas condiciones probadas. De los pigmentos analizados, en los carotenoides no hubo diferencias significativas. En cuanto a las clorofilas se observó un

incremento significativo en las plantas inoculadas con el hongo pretratado y en presencia de Pb (Dv+H_{CE}+Pb), de clorofilas a y b de 1.8 y 2.8 veces, respectivamente, respecto a las plantas sin inóculo y en exposición a Pb (Dv+Pb). Mientras que, en las plantas en condiciones Dv+H_{CE} la clorofila b fue 2.2 veces mayor, comparadas con la condición Dv+Pb. Se ha reportado que generalmente la clorofila b es más sensible a la degradación inducida por estrés (Xiong *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que la inoculación con el hongo pretratado tuvo un efecto positivo sobre la salud de la planta, al aumentar significativamente el contenido de clorofila b, aun en presencia del contaminante.

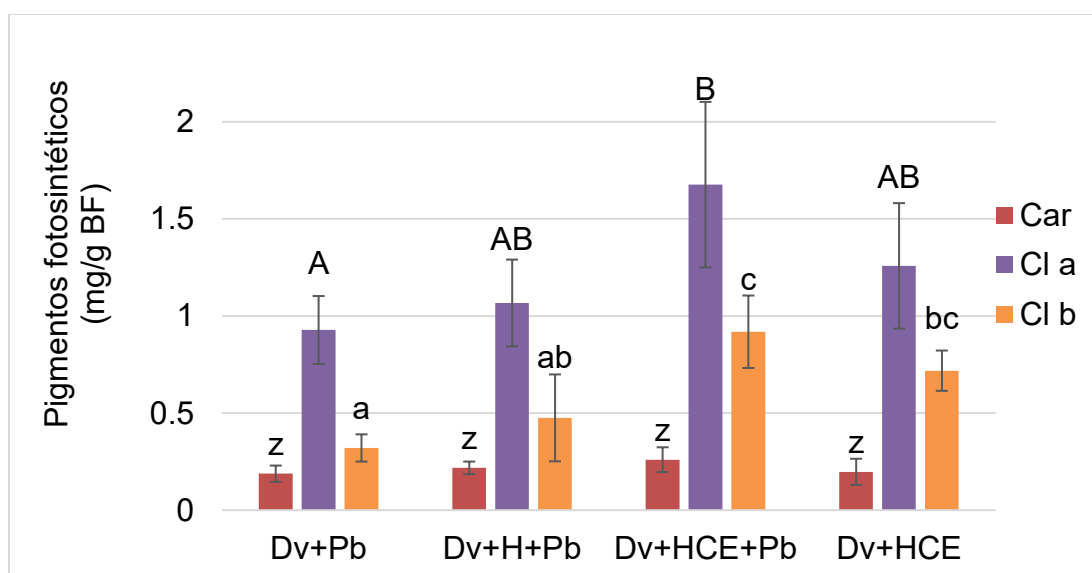


Figura 18. Concentración de pigmentos fotosintéticos en plantas de *D. viscosa* en las diferentes condiciones analizadas, después de 50 días de cultivo. **Dv+Pb:** Planta con Pb; **Dv+H+Pb:** Planta y hongo, con Pb; **Dv+H_{CE}+Pb:** Planta y hongo pretratado (CE), con Pb; **Dv+H_{CE}:** Planta y hongo pretratado (CE), sin Pb. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$, $n=4$).

En las condiciones analizadas, las plantas expuestas al Pb sin inocular (Dv+Pb) presentaron el contenido más bajo de pigmentos. Existen estudios que indican que la exposición a MP como el Pb, causa una disminución en el contenido de pigmentos fotosintéticos en las plantas. Por ejemplo, Akinci *et al.*, (2010), expusieron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) a diferentes concentraciones de Pb (75, 150 y 300 mg/kg), y observaron que el contenido de clorofila a y b disminuyó por efecto de la presencia del metal, siendo un mayor efecto en la concentración de 300 mg/kg de Pb. Liu *et al.* (2022), evaluaron el potencial de fitorremediación de Pb en alfalfa (*Medicago sativa*), reportando una disminución progresiva en el contenido de clorofilas conforme aumentaba la concentración de Pb (0-500 mg/kg). Esta inhibición se puede atribuir a distintas

interacciones directas sobre los cloroplastos, así como a modificaciones en procesos fisiológicos. Como el Pb tiene una alta afinidad por proteínas y otros componentes de la membrana, induciendo la peroxidación lipídica, lo que llega a resultar en una distorsión de la ultraestructura de los cloroplastos y a un daño en las membranas tilacoides (Gupta *et al.*, 2024). También el Pb provoca una disminución de la actividad de la ácido delta-aminolevulínico sintetasa (ALAS), enzima crucial en la biosíntesis de clorofila. Otra manera en la que el Pb disminuye el contenido de pigmentos fotosintéticos es mediante la sustitución del Mg por el Pb en los tejidos vegetales, lo que inhibe la actividad enzimática y el transporte de electrones en el ciclo de Calvin y restringe la síntesis de clorofila (Tian *et al.*, 2014). El Pb puede también contribuir a la degradación de las clorofilas de manera indirecta al inducir la actividad de la enzima clorofilasa (Liu *et al.*, 2022).

De manera similar a los resultados de este estudio, Likar y Regvar (2013), estudiaron el efecto de un hongo septado oscuro del género *Leohumicola*, en plantas de *Salix caprea* sembradas en un suelo contaminado con una mezcla de metales (Pb 2.439, Cd 32.4, Zn 40.5). Los autores observaron un aumento de casi 3 veces en el contenido de pigmentos fotosintéticos en comparación con las plantas no inoculadas. Estos resultados muestran que la inoculación con ciertos microorganismos puede inducir respuestas benéficas en las plantas, mejorando atributos relacionados a la capacidad fotosintética y, en consecuencia, aumentando su tolerancia a contaminantes como el plomo.

Actividad antioxidante guayacol peroxidasa (G-POX)

El contenido de clorofila es un importante indicador del estado de salud en el que se encuentren las plantas, aunque no es el único. Cuando el Pb se acumula en los tejidos vegetales induce estrés oxidante que, para sobrellevarlo las plantas cuentan con mecanismos de defensa antioxidante, como la actividad de la enzima G-POX. Cuypers *et al.*, (2002), mencionan que la actividad de las peroxidases se puede utilizar como un biomarcador potencial para la toxicidad de MP. Esta enzima elimina el H₂O₂, una ERO con efectos nocivos en las membranas celulares, lo que convierte la actividad de esta enzima en una variable importante para conocer el nivel de estrés en plantas expuestas a contaminantes, y por lo tanto de la salud de las plantas (Mansoor *et al.*, 2023).

La actividad G-POX en tallos de *D. viscosa* no mostró diferencias significativas, independientemente de la presencia o ausencia del hongo, o del Pb (Figura 19). En cambio, en las raíces de las plantas sin inóculo fue evidente el estrés causado por el Pb,

presentando una actividad G-POX significativamente mayor en comparación con las plantas en condiciones Dv+H+Pb y Dv+H_{CE}, teniendo 40 y 57% menos actividad, respectivamente.

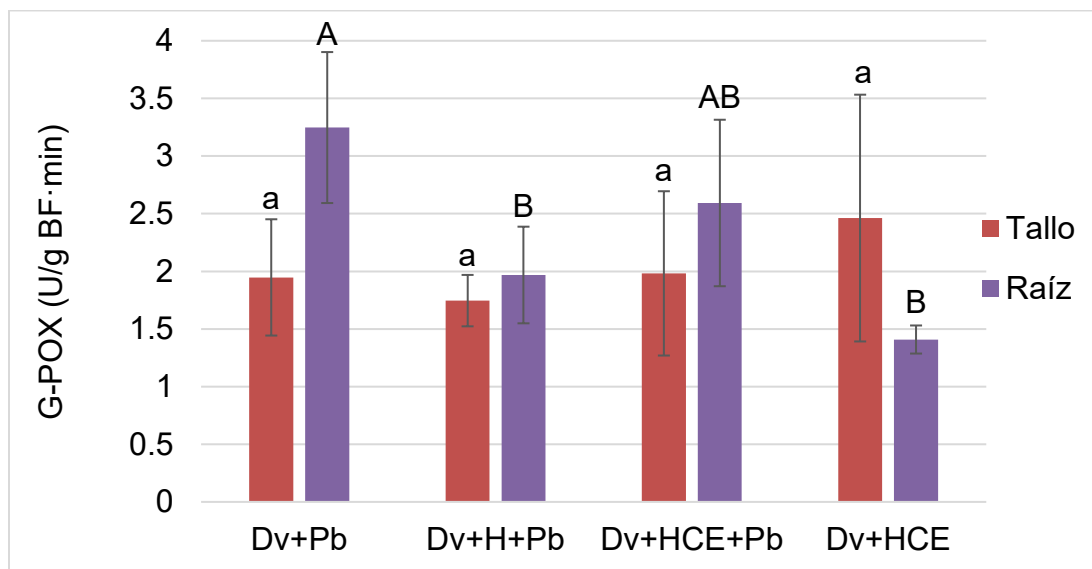


Figura 19. Actividad de la enzima Guayacol peroxidasa (G-POX) en plantas de *D. viscosa* en las diferentes condiciones analizadas, después de 50 días de cultivo. **Dv+Pb:** Planta con Pb; **Dv+H+Pb:** Planta y hongo, con Pb; **Dv+H_{CE}+Pb:** Planta y hongo pretratado (CE), con Pb; **Dv+H_{CE}:** Planta y hongo pretratado (CE), sin Pb. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$, $n = 4$).

Un comportamiento similar fue reportado por Anicacio (2014) en plantas de *D. viscosa* expuestas al Pb en presencia y ausencia de *Cladosporium* sp., observando una mayor actividad de la G-POX en plantas sin inóculo, comparadas con las plantas inoculadas. De igual manera Zhang *et al.*, (2007), observaron un aumento en la actividad POX (330%) en raíces de *K. candel* expuestas a una mezcla de metales pesados (Pb: 10 mg/kg, Cd: 1 mg/kg y Hg: 1 mg/kg).

En el presente estudio se observó que en las raíces de *D. viscosa* asociada con el hongo sin tratar y con plomo (Dv+H+Pb), al igual que la planta asociada al hongo pretratado (Dv+H_{CE}) presentó una menor actividad G-POX, respecto a los otros tratamientos. Hasta cierto punto, la respuesta de la planta en ausencia del Pb se esperaba, debido a la ausencia del agente causante del estrés (Pb). Sin embargo, en el tratamiento con el hongo y Pb (Dv+H+Pb), esta respuesta se puede atribuir a la presencia del hongo en el soporte, debido a que los hongos endófitos restringen la entrada de MP en las plantas a través de diferentes mecanismos protegiendo el crecimiento de la planta de un entorno contaminado. Además, la forma de los MP en el suelo puede ser modificada por polisacáridos y ácidos orgánicos mejorando el entorno ecológico circundante (Kumar *et al.*, 2021).

En el caso de las plantas inoculadas con el hongo pretratado expuestas a Pb (Dv+H_{CE}+Pb) no hubo diferencias significativas con respecto a las plantas expuestas al contaminante sin inocular (Dv+Pb), teóricamente más afectadas por la toxicidad del Pb. Esto puede deberse a la alteración en el metabolismo del hongo debido a que, normalmente, para que el hongo colonice o establezca una relación con un hospedero se activan mecanismos que inducen una respuesta antioxidante por parte de la planta. Dentro de estos mecanismos se encuentran moléculas de señalización como el H₂O₂ que se difunde a través de las membranas, por lo que se considera el segundo mensajero de las señales producidas por las ERO (Choudhury *et al.*, 2017). De esta manera, se observó que las plantas bajo la condición Dv+H_{CE}+Pb mostraron mayor actividad G-POX en las raíces respecto a las condiciones Dv+H+Pb y Dv+H_{CE}, este resultado puede deberse a la colonización del hongo pretratado en las raíces, lo que podría estar indicando que en las plantas bajo las condiciones P+H_{CE}, sin Pb, existe una mayor actividad G-POX en la parte aérea, cuando lo común es encontrarla en las raíces, invirtiendo la relación de la actividad G-POX en tallo y raíz.

6.3.3 Contenido de Pb en tejidos vegetales

La entrada de Pb en las plantas ocurre a través de la absorción por las raíces, este elemento sufre interacciones químicas dentro de la planta que afectan su dispersión y toxicidad (Srivastava *et al.*, 2022). La acumulación de Pb en las partes comestibles de las plantas representa un riesgo significativo para la salud humana, impactando severamente en el sistema nervioso principalmente.

Los datos de bioacumulación de Pb en *D. viscosa* muestran que el hongo *Cladosporium* sp. con y sin pretratamiento, redujo significativamente la concentración de Pb en raíces alrededor de 50 y 36% respectivamente, y tallos cerca de 60% en ambos casos (Fig. 20). Siendo las plantas inoculadas con el hongo pretratado (Dv+H_{CE}+Pb) las que presentaron los mejores resultados, ya que mostraron la menor concentración de Pb en raíces. En cuanto al FT en todas las condiciones analizadas el valor fue menor a 1 (Tabla 3).

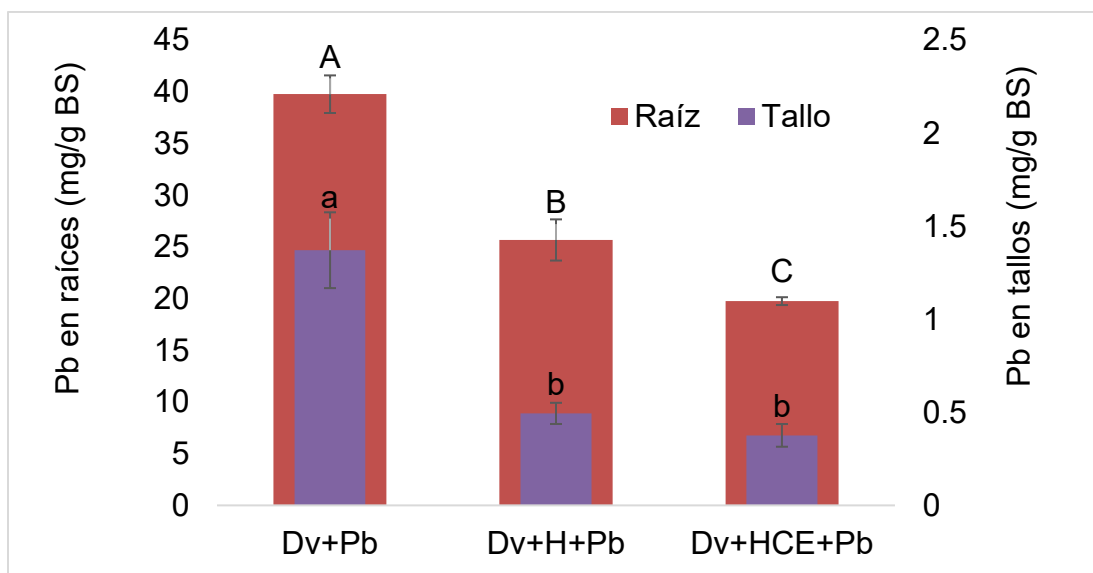


Figura 20. Acumulación de Pb en plantas de *D. viscosa* en las diferentes condiciones analizadas, después de 50 días de cultivo. **Dv+Pb:** Planta con Pb; **Dv+H+Pb:** Planta y hongo, con Pb; **Dv+H_{CE}+Pb:** Planta y hongo pretratado (CE). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$, $n=9$).

Tabla 3. Acumulación de Pb y factor de translocación en plantas de *D. viscosa* en las diferentes condiciones analizadas, después de 50 días de cultivo. **Dv+Pb:** Planta con Pb; **Dv+H+Pb:** Planta y hongo, con Pb; **Dv+H_{CE}+Pb:** Planta y hongo pretratado (CE). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$, $n=6$).

	Acumulación de Pb		Factor de translocación (FT)
	Tallo	Raíz	
Dv+Pb	1.37±0.2 a	39.7±1.81 a	0.035±0.004 a
Dv+H+Pb	0.49±0.05 b	25.6±2 b	0.019±0.001 b
Dv+H_{CE}+Pb	0.37±0.06 b	19.7±0.37 c	0.019±0.003 b

Estos resultados coinciden con lo reportado por Anicacio (2014), quien observó que la inoculación de *D. viscosa* con *Cladosporium* sp. redujo 43% la bioacumulación de Pb. Otros estudios que exploran la inoculación con hongos septados oscuros en plantas expuestas a MP respaldan esta tendencia. Marfuah *et al.* (2024) evaluaron las respuestas morfológicas, anatómicas y fisiológicas, así como la acumulación de Pb por *Jatropha curcas* y *Reutealis trisperma* inoculados con *Cladosporium* sp. y *Rhizopycnis vagum*, cultivadas en residuos

de minería de oro. Ambas especies mostraron potencial para su uso en fitorremediación, aunque, mediante mecanismos distintos; mientras que *J. curcas* presentó mecanismos asociados con la fitoextracción, *R. trisperma* fue clasificada como fitoestabilizadora, debido a que obtuvo un factor de FT a 1. Esto evidencia que el mecanismo de fitorremediación en cada caso depende de los organismos y las características del MP (Marfuah *et al.*, 2024).

La alta bioacumulación de Pb en las raíces de las plantas en la condición Dv+Pb, fue una respuesta esperada, puesto que se ha demostrado que *D. viscosa* acumula este MP principalmente en las raíces en concentraciones hasta de 33,000 mg/kg después de 45 días de exposición (Rojas-Loria *et al.*, 2014). En las plantas cultivadas en las condiciones P+H+Pb y P+H_{CE}+Pb, se observó una disminución en la acumulación del metal, lo que sugiere que la presencia del hongo limita la acumulación en los tejidos de la planta. De hecho, los hongos endófitos pueden influir en la absorción de MP y restringir su entrada a través de diversos procesos biogeoquímicos, incluyendo la quelación, inmovilización, y complejación de metales pesados (Domka *et al.*, 2019; Durand *et al.*, 2021).

Este efecto observado en *D. viscosa*, puede atribuirse a la inmovilización del Pb en los compuestos de la pared celular de *Cladosporium* sp., particularmente las melaninas. Con base en los resultados obtenidos del pretratamiento electroquímico en donde se encontró que el contenido de melanina aumentó por efecto del pretratamiento del hongo con CE, puede sugerirse que este pigmento está involucrado en la menor acumulación de Pb en raíces en el tratamiento P+H_{CE}+Pb. Con estos resultados se puede concluir que *Cladosporium* sp. pretratado con CE puede ser utilizado en procesos de fitorremediación asistida, a través de la estimulación de mecanismos de fitoestabilización.

Los resultados obtenidos indican que la inoculación con el hongo pretratado si tiene un impacto positivo sobre la tolerancia de *D. viscosa* al Pb, mejorando el crecimiento, aumentando el contenido de clorofilas a y b y disminuyendo la concentración de Pb en los órganos de la planta. Estos resultados fueron más significativos cuando la asociación planta-hongo pretratado se encontraba expuesta a Pb.

Por lo tanto, la presencia de Pb en el soporte podría estar influyendo en los mecanismos de respuesta del hongo pretratado, que impactan es su interacción con la planta. Esto resalta la necesidad de profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares implicados en esta asociación, con el fin de proporcionar una explicación más sólida sobre los fenómenos que causan este efecto sobre la planta. En este sentido, el presente estudio

puede representar un punto de partida para el desarrollo de inóculos modificados o mejorados para atender las problemáticas mundiales concernientes al medio ambiente, la salud humana y la seguridad alimentaria, puesto que los DSE exhiben efectos positivos en plantas no hospedantes, es decir, en plantas en las que no se ha reportado este hongo como endófito (Li *et al.*, 2018). Lo que los convierte en candidatos ideales para la inoculación de distintas especies de plantas de interés económico o alimenticio, expuestas a contaminación por MP.

7 Conclusiones

La inoculación de *D. viscosa* con el hongo DSE *Cladosporium* sp. aumentó su tolerancia al Pb y mejoró el crecimiento vegetal en presencia del metal.

La exposición de conidios de *Cladosporium* sp. a una intensidad de 10 mA, tuvo un impacto positivo, aumentando la biomasa, el contenido de melanina y compuestos antioxidantes.

La asociación de *D. viscosa* con el hongo pretratado con CE, además de mejorar el crecimiento de la planta en presencia de Pb, disminuyó la bioacumulación en tallos y raíces, estimulando el crecimiento y la concentración de pigmentos fotosintéticos.

Dicho esto, se sugiere que el inóculo de *Cladosporium* sp. pretratado con CE puede utilizarse para asistir en procesos de fitoestabilización de Pb.

8 Perspectivas

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se proponen las siguientes perspectivas para estudios posteriores:

- Evaluar el efecto de la CE en la tolerancia del *Cladosporium* sp. al Pb, con el fin de saber si es posible aumentar la concentración de Pb en los experimentos.
- Examinar la acumulación de Pb en *Cladosporium* sp. inoculado en *D. viscosa* expuesta al Pb, así como la disponibilidad del metal en el soporte.
- Analizar el contenido de fitohormonas en *D. viscosa* inoculada con *Cladosporium* sp pretratado, para tener una mejor idea de cómo es que se está estimulando el crecimiento de la planta.
- Determinar si es que la presencia del *Cladosporium* sp pretratado, induce la producción de exudados por parte de la planta, que pudieran estabilizar el metal en el soporte y así disminuir la toxicidad del Pb o el paso al interior de los tejidos.
- Probar el inóculo pretratado en condiciones de invernadero o en campo y en plantas de interés alimentario.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, Z., Khan, S. M., Page, S. E., Balzter, H., Ullah, A., Ali, S., ... Mukhamezhanova, A. S. (2023). Environmental sustainability and resilience in a polluted ecosystem via phytoremediation of heavy metals and plant physiological adaptations. *Journal of Cleaner Production*, 385, 135733. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135733>
- Ailijiang, N., Chang, J., Wu, Q., Li, P., Liang, P., Zhang, X., & Huang, X. (2016). Phenol degradation by suspended biomass in aerobic/anaerobic electrochemical reactor. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(7), 233.
- Akhatar, O., Sharma, H., Zoomi, I., Chaudhary, K. L., & Kumar, M. (2022). Metallophytes. In *Heavy Metals in Plants* (pp. 354-368). CRC Press.
- Akinci, I. E., Akinci, S., & Yilmaz, K. (2010). Response of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to lead toxicity: Growth, element uptake, chlorophyll and water content. *African Journal of Agricultural Research*, 5(6), 416–423.
- Al-Namazi, A. A., Al-Ammari, B. S., Davy, A. J., & Al-Turki, T. A. (2020). Seed dormancy and germination in *Dodonaea viscosa* (Sapindaceae) from south-western Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(9), 2420–2424. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.06.013>
- Al-Snafi, A. E. (2017). A review on *Dodonaea viscosa*: A potential medicinal plant. *IOSR Journal of Pharmacy*, 7(2), 10–21.
- Andrade-Linares, D. R., Lehmann, A., & Rillig, M. C. (2016). Microbial stress priming: A meta-analysis. *Environmental Microbiology*, 18(4), 1277–1288. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13223>
- Anicacio, B. E. (2014). *Influencia de la asociación inducida entre Dodonaea viscosa y un hongo endófito sobre la tolerancia y bioacumulación de plomo y su relación con la actividad de enzimas antioxidantes* [Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana].
- Aslam, M., Aslam, A., Sheraz, M., Ali, B., Ulhassan, Z., Najeeb, U., Zhou, W., & Gill, R. A. (2021). Lead toxicity in cereals: Mechanistic insight into toxicity, mode of action, and management. *Frontiers in Plant Science*, 11, 587785. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.587785>
- Audet, P., & Charest, C. (2007). Heavy metal phytoremediation from a meta-analytical perspective. *Environmental Pollution*, 147(1), 231-237.
- Ayilara, M. S., & Babalola, O. O. (2023). Bioremediation of environmental wastes: the role of microorganisms. *Frontiers in Agronomy*, 5, 1183691.
- Bai, Z., Harvey, L. M., White, S., & McNeil, B. (2004). Effects of oxidative stress on production of heterologous and native protein, and culture morphology in batch and chemostat cultures of *Aspergillus niger* B1-D. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(1), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.09.012>
- Ban, Y., Tan, J., Xiong, Y., Mo, X., Li, W., Jia, C., ... Xu, Z. (2023). The responses and detoxification mechanisms of dark septate endophytes (*Exophiala salmonis*) to CuO nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(5), 13773–13787. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24717-6>

- Baskin, C. C. (2003). Breaking physical dormancy in seeds—Focusing on the lens. *New Phytologist*, 158(2), 229–232. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00755.x>
- Beltran-García, M. J., Prado, F. M., Oliveira, M. S., Ortiz-Mendoza, D., Scalfo, A. C., Pessoa, A., ... Di Mascio, P. (2014). Singlet molecular oxygen generation by light-activated DHN-melanin of the fungal pathogen *Mycosphaerella fijiensis* in black Sigatoka disease of bananas. *PLoS ONE*, 9(3), e91616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091616>
- Beretta, G., Mastorgio, A. F., Pedrali, L., Saponaro, S., & Sezenna, E. (2019). The effects of electric, magnetic and electromagnetic fields on microorganisms in the perspective of bioremediation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 18, 29–75. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9481-6>
- Berthelot, C., Perrin, Y., Leyval, C., & Blaudez, D. (2017). Melanization and ageing are not drawbacks for successful agro-transformation of dark septate endophytes. *Fungal Biology*, 121(7), 652–663. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.03.007>
- Bilal, S., Shahzad, R., Khan, A. L., Al-Harrasi, A., Kim, C. K., & Lee, I. J. (2019). Phytohormones enabled endophytic *Penicillium funiculosum* LHL06 protects *Glycine max* L. from synergistic toxicity of heavy metals by hormonal and stress-responsive proteins modulation. *Journal of Hazardous Materials*, 379, 120824. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120824>
- Cameselle, C., & Gouveia, S. (2019). Phytoremediation of mixed contaminated soil enhanced with electric current. *Journal of Hazardous Materials*, 361, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.085>
- Campillo-Cora, C., Rodríguez-Seijo, A., Pérez-Rodríguez, P., Fernández-Calviño, D., & Santás-Miguel, V. (2025). Effect of heavy metal pollution on soil microorganisms: Influence of soil physicochemical properties. A systematic review. *European Journal of Soil Biology*, 124, 103706.
- Caravanos, J., Dowling, R., Téllez-Rojo, M. M., Cantoral, A., Kobrosly, R., Estrada, D., ... Fuller, R. (2014). Niveles de plomo en sangre en México y su implicación para la carga pediátrica de la enfermedad. *Annals of Global Health*, 80(4), e1–e11. <https://doi.org/10.1016/j.aogh.2014.09.002>
- Castillo-Minjarez, J. M., Garza-López, P. M., Barrios-Gonzalez, J., & Loera, O. (2019). Free conidia of entomopathogenic fungi modify quality traits by changing glutathione levels after an oxidant stimulus. *Biological Control*, 137, 104011.
- Chance, B., & Maehly, A. C. (1955). [136] Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2, 764–775. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8)
- Chiu, K. Y. (2015). Ultrasonication-enhanced microbial safety of sprouts produced from selected crop species. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 88, 120-126.
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, 90(5), 856-867.
- Coban, O., De Deyn, G. B., & van der Ploeg, M. (2022). Soil microbiota as game-changers in restoration of degraded lands. *Science*, 375(6584), abe0725.
- Cook, A., Turner, S. R., Baskin, J. M., Baskin, C. C., Steadman, K. I., & Dixon, K. W. (2008). Occurrence of physical dormancy in seeds of Australian Sapindaceae: A survey of 14 species in nine genera. *Annals of Botany*, 101, 1349–1362. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn038>

- Cuypers, A. N. N., Vangronsveld, J., & Clijsters, H. (2002). Peroxidases in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*: Copper and zinc phytotoxicity—a comparison. *Journal of Plant Physiology*, 159(8), 869–876. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00710>
- Diao, H. F., Li, X. Y., Gu, J. D., Shi, H. C., & Xie, Z. M. (2004). Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction. *Process biochemistry*, 39(11), 1421-1426.
- Domka, A. M., Rozpadek, P., & Turnau, K. (2019). Are fungal endophytes merely mycorrhizal copycats? The role of fungal endophytes in the adaptation of plants to metal toxicity. *Frontiers in Microbiology*, 10, 371. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00371>
- Durand, A., Leglize, P., & Benizri, E. (2021). ¿Are endophytes essential partners for plants and what are the prospects for metal phytoremediation? *Plant and Soil*, 460, 1–30. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04755-x>
- Egorova, A. S., Gessler, N. N., & Belozerskaya, T. A. (2011). Melanin pigments in the fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 437(1), 84. <https://doi.org/10.1134/S1607672911020159>
- Felizardo, L. M., Prates, A. R., Oliverio, G. L., Maltoni, K. L., Lopes, B. G., & Faria, G. A. (2021). Ultrasonido de baja frecuencia como potenciador para el proceso de germinación de *Stizolobium pruriens*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(5), 765–776. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i5.1536>
- Fernández, R., Fernández-Fuego, D., Bertrand, A., et al. (2014). Strategies for Cd accumulation in *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter: Role of the cell wall, non-protein thiols and organic acids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 78, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.014>
- Gessler, N. N., Egorova, A. S., & Belozerskaya, T. A. (2014). Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50(2), 105–113. <https://doi.org/10.1134/S0003683814020082>
- Gong, X., Huang, D., Liu, Y., Zeng, G., Wang, R., Wei, J., Huang, C., Xu, P., Wan, J., & Zhang, C. (2018). Pyrolysis and reutilization of plant residues after phytoremediation of heavy metals contaminated sediments: For heavy metals stabilization and dye adsorption. *Bioresource Technology*, 253, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.059>
- Guhr, A., & Kircher, S. (2020). Drought-induced stress priming in two distinct filamentous saprotrophic fungi. *Microbial Ecology*, 80(1), 27–33. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01426-1>
- Gupta, M., Dwivedi, V., Kumar, S., Patel, A., Niazi, P., & Yadav, V. K. (2024). Lead toxicity in plants: mechanistic insights into toxicity, physiological responses of plants and mitigation strategies. *Plant Signaling & Behavior*, 19(1), 2365576.
- Harish, E., & Oshero, N. (2022). Fungal priming: Prepare or perish. *Journal of Fungi*, 8(5), 448. <https://doi.org/10.3390/jof8050448>
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., ... & Fotopoulos, V. (2020). Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 9(8), 681.
- He, X. M., Xu, M. J., Wei, Q. P., Tang, M. Y., Guan, L. K., Lou, L. Q., Xu, X. M., Hu, Z. B., Chen, Y. H., Shen, Z. G., & Xia, Y. (2020). Promotion of growth and phytoextraction of cadmium and lead in

Solanum nigrum L. mediated by plant-growth-promoting rhizobacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 205, 111333. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111333>

Hilker, M., Schwachtje, J., Baier, M., Balazadeh, S., Bäurle, I., Geiselhardt, S., Hinch, D. K., Kunze, R., Mueller-Roeber, B., Rillig, M. C., Rolff, J., Romeis, T., Schmülling, T., Steppuhn, A., van Dongen, J., Whitcomb, S. J., Wurst, S., Zuther, E., & Kopka, J. (2015). Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. *Biological Reviews*, 91(4), 1118–1133. <https://doi.org/10.1111/brv.12112>

Hossain, M., Piyatida, P., Teixeira da Silva, J. A., & Fujita, M. (2012). Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: Central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany*, 2012, Article ID 872875, 37 pages. <https://doi.org/10.1155/2012/872875>

Hosseini, M. R., Schaffie, M., Pazouki, M., & Ranjbar, M. (2014). Direct electric current stimulation of protein secretion by *Fusarium oxysporum*. *Chemical Engineering Communications*, 201(2), 160–170. <https://doi.org/10.1080/00986445.2012.736340>

Hu, T., Jin, Y., Li, H., Amombo, E., & Fu, J. (2016). Stress memory induced transcriptional and metabolic changes of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in response to salt stress. *Physiologia Plantarum*, 156(1), 54–69. <https://doi.org/10.1111/ppl.12398>

Huang, D., Xu, Q., Cheng, J., Lu, X., & Zhang, H. (2012). Electrokinetic remediation and its combined technologies for removal of organic pollutants from contaminated soils. *International Journal of Electrochemical Science*, 7, 4528–4544.

Iordache, V., & Neagoe, A. (2023). Conceptual methodological framework for the resilience of biogeochemical services to heavy metals stress. *Journal of Environmental Management*, 325, 116401.

Jacob, J. M., Karthik, C., Saratale, R. G., Kumar, S. S., Prabakar, D., Kadirvelu, K., & Pugazhendhi, A. (2018). Biological approaches to tackle heavy metal pollution: a survey of literature. *Journal of environmental management*, 217, 56-70.

Jin, H. Q., Liu, H. B., Xie, Y. Y., Zhang, Y. G., Xu, Q. Q., Mao, L. J., ... & Zhang, C. L. (2018). Effect of the dark septate endophytic fungus *Acrocalymma vagum* on heavy metal content in tobacco leaves. *Symbiosis*, 74(2), 89-95.

Kanwal, A., Farhan, M., Sharif, F., Hayyat, M. U., Shahzad, L., & Ghafoor, G. Z. (2020). Effect of industrial wastewater on wheat germination, growth, yield, nutrients and bioaccumulation of lead. *Scientific Reports*, 10, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68376-4>

Khalid, M., Ur-Rahman, S., Hassani, D., Hayat, K., Zhou, P., & Hui, N. (2021). Advances in fungal-assisted phytoremediation of heavy metals: A review. *Pedosphere*, 31(3), 475–495. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(20\)60084-0](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(20)60084-0)

Khare, E., Mishra, J., & Arora, N. K. (2018). Multifaceted interactions between endophytes and plant: Developments and prospects. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2732. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02732>

Kim, S. H., Han, H. Y., Lee, Y. J., Kim, C. W., & Yang, J. W. (2010). Effect of electrokinetic remediation on indigenous microbial activity and community within diesel contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 408(16), 3162-3168.

- Kong, Z. Y., & Glick, B. R. (2017). The role of plant growth-promoting bacteria in metal phytoremediation. *Advances in Microbial Physiology*, 71, 1–28. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.06.001>
- Kreiner, M., Harvey, L. M., & McNeil, B. (2003). Morphological and enzymatic responses of a recombinant *Aspergillus niger* to oxidative stressors in chemostat cultures. *Journal of Biotechnology*, 100(3), 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00401-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00401-7)
- Król, Ż., & Jarmoluk, A. (2016). The effects of using a direct electric current on the chemical properties of gelatine gels and bacterial growth. *Journal of food engineering*, 170, 1-7.
- Kumar, A., & Prasad, M. N. V. (2018). Plant-lead interactions: transport, toxicity, tolerance, and detoxification mechanisms. *Ecotoxicology and environmental safety*, 166, 401-418.
- Kumar, A., Kumar, A., Chaturvedi, A. K., Shabnam, A. A., Subrahmanyam, G., Mondal, R., ... & Yadav, K. K. (2020). Lead toxicity: health hazards, influence on food chain, and sustainable remediation approaches. *International journal of environmental research and public health*, 17(7), 2179.
- Kumar, A., Yadav, A. N., Mondal, R., Kour, D., Subrahmanyam, G., Shabnam, A. A., ... & Malyan, S. K. (2021). Myco-remediation: A mechanistic understanding of contaminants alleviation from natural environment and future prospect. *Chemosphere*, 284, 131325.
- Kumar, V., & Dwivedi, S. K. (2021). Mycoremediation of heavy metals: processes, mechanisms, and affecting factors. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(9), 10375-10412.
- Li, C., Zhou, K., Qin, W., Tian, C., Qi, M., Yan, X., & Han, W. (2019). A review on heavy metals contamination in soil: Effects, sources, and remediation techniques. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 28(4), 380–394. <https://doi.org/10.1080/15320383.2019.1586057>
- Li, Q., Liu, H., Alattar, M., et al. (2015). The preferential accumulation of heavy metals in different tissues following frequent respiratory exposure to PM2.5 in rats. *Scientific Reports*, 5, 16936. <https://doi.org/10.1038/srep16936>
- Li, X., He, X. L., Hou, L. F., Ren, Y., Wang, S. J., & Su, F. (2018). Dark septate endophytes isolated from a xerophyte plant promote the growth of *Ammopiptanthus mongolicus* under drought condition. *Scientific Reports*, 8, 7896. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26284-0>
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents.
- Likar, M., & Regvar, M. (2013). Isolates of dark septate endophytes reduce metal uptake and improve physiology of *Salix caprea* L. *Plant and Soil*, 370(1–2), 593–604. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1685-6>
- Liu, C., Wang, Y., Zhang, X., Zhang, G. L., Liu, X., Gao, P., & Yao, S. (2022). Antioxidant response by alfalfa (*Medicago sativa* L.) to Pb pollution—A study to value the feasibility of soil phytoremediation. *Soil & Water Research*, 17(3). <https://doi.org/10.17221/107/2021-SWR>
- Liu, H., Able, A. J., & Able, J. A. (2022). Priming crops for the future: rewiring stress memory. *Trends in plant science*, 27(7), 699-716.

- Liu, L. W., Li, W., Song, W. P., & Guo, M. X. (2018). Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: Principles and applicability. *Science of The Total Environment*, 633, 206–219. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.161>
- Luo, Q., Wang, H., Zhang, X., & Qian, Y. (2005). Effect of direct electric current on the cell surface properties of phenol-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 423–427. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.423-427.2005>
- Małecka, A., Konkolewska, A., Hanć, A., Ciszewska, L., Staszak, A. M., Jarmuszkiewicz, W., & Ratajczak, E. (2021). Activation of antioxidative and detoxificative systems in *Brassica juncea* L. plants against the toxicity of heavy metals. *Scientific Reports*, 11(1), 22345.
- Malik, M. N., et al. (2022). Bioprospecting *Dodonaea viscosa* Jacq.; a traditional medicinal plant for antioxidant, cytotoxic, antidiabetic and antimicrobial potential. *Arabian Journal of Chemistry*, 15, 103688. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103688>
- Manoj, S. R., Karthik, C., Kadirvelu, K., et al. (2020). Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. *Journal of Environmental Management*, 254, 109779. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109779>
- Mansoor, S., Ali, A., Kour, N., Bornhorst, J., AlHarbi, K., Rinklebe, J., ... & Chung, Y. S. (2023). Heavy metal induced oxidative stress mitigation and ROS scavenging in plants. *Plants*, 12(16), 3003.
- Marfuah, D. S., Hamim, H., Sulistyaningsih, Y. C., Surono, S., Setyaningsih, L., & Saprudin, D. (2024). Dark septate endophyte inoculation improved Pb phytoremediation of *Jatropha curcas* and *Reutealis trisperma* on gold mine tailings. *Bioremediation Journal*, 28(3), 325–342. <https://doi.org/10.1080/10889868.2023.2279194>
- Mir, R. A., & Khah, M. A. (2024). Recent progress in enzymatic antioxidant defense system in plants against different environmental stresses. *Improving stress resilience in plants*, 203–224.
- Montiel-Rozas, M. D. M., Madejón, E., & Madejón, P. (2015). Evaluation of phytostabilizer ability of three ruderal plants in mining soils restored by application of organic amendments. *Ecological Engineering*, 83, 431–436. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.07.030>
- Muthusaravanan, S., Sivarajasekar, N., Vivek, J. S., Paramasivan, T., Naushad, M., Prakashmaran, J., Gayathri, V., & Al-Duaij, O. K. (2018). Phytoremediation of heavy metals: Mechanisms, methods and enhancements. *Environmental Chemistry Letters*, 16(4), 1339–1359. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0756-x>
- Naumann, B., Eberius, M., & Appenroth, K. J. (2007). Growth rate based dose–response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St. *Journal of Plant Physiology*, 164(12), 1656–1664.
- Naveen, B., Mahapatra, D. M., Sitharam, T., Sivapullaiah, P., & Ramachandra, T. (2017). Physico-chemical and biological characterization of urban municipal landfill leachate. *Environmental Pollution*, 220, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.025>
- Nawab, J., Khan, S., Shah, M. T., Gul, N., Ali, A., Khan, K., & Huang, Q. (2016). Heavy metal bioaccumulation in native plants in chromite impacted sites: A search for effective remediating plant species. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 44(1), 37–46. <https://doi.org/10.1002/clen.201400314>

- Nogawa, K., Honda, R., Kido, T., et al. (1987). Limits to protect people eating cadmium in rice, based on epidemiological studies. *Trace Substances in Environmental Health*, 21, 431–439.
- Otero-Blanca, A., Folch-Mallol, J. L., Lira-Ruan, V., del Rayo Sánchez Carbente, M., & Batista-García, R. A. (2018). Phytoremediation and fungi: An underexplored binomial. In *Approaches in Bioremediation: The New Era of Environmental Microbiology and Nanobiotechnology* (pp. 79–95). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75556-0_6
- Padhan, D., Rout, P. P., Kundu, R., Adhikary, S., & Padhi, P. P. (2021). Bioremediation of heavy metals and other toxic substances by microorganisms. In *Soil bioremediation: An approach towards sustainable technology* (pp. 285–329). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-56714-7_12
- Papa, J. C. M., Felizia, J. C., & Esteban, A. J. (2000). Tolerancia y resistencia a herbicidas. *línea] Rosario, Santa Fe, Centro Regional Santa Fe* (<http://www.calandri.com.ar/soja/mcresistencia.htm>).
- Park, J. C., Lee, M. S., Lee, D. H., Park, B. J., Han, D. W., Uzawa, M., & Takatori, K. (2003). Inactivation of bacteria in seawater by low-amperage electric current. *Applied and environmental microbiology*, 69(4), 2405-2408.
- Patel, A. K., Singhanian, R. R., Albarico, F. P. J. B., Pandey, A., Chen, C. W., & Dong, C. D. (2022). Organic wastes bioremediation and its changing prospects. *Science of the Total Environment*, 824, 153889.
- Poveda, J., Eugui, D., Abril-Urías, P., & Velasco, P. (2021). Endophytic fungi as direct plant growth promoters for sustainable agricultural production. *Symbiosis*, 85(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s13199-021-00771-4>
- Qin, Y.-C., Lee, W.-C., Choi, Y.-C., & Kim, T.-W. (2003). Biochemical and physiological changes in plants as a result of different sonic exposures. *Ultrasonics*, 41, 407–411. [https://doi.org/10.1016/S0041-624X\(03\)00069-0](https://doi.org/10.1016/S0041-624X(03)00069-0)
- Qiu, J., Song, X., Li, S., Zhu, B., Chen, Y., Zhang, L., & Li, Z. (2021). Experimental and modeling studies of competitive Pb (II) and Cd (II) bioaccumulation by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(16), 6477–6488. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11443-9>
- Quan, L., Shi, L., Zhang, S., Yao, Q., Yang, Q., Zhu, Y., ... & Xia, Y. (2023). Ectomycorrhizal fungi, two species of *Laccaria*, differentially block the migration and accumulation of cadmium and copper in *Pinus densiflora*. *Chemosphere*, 334, 138857. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138857>
- Radziemska, M., Koda, E., Bilgin, A., & Vavrková, M. D. (2018). Concept of aided phytostabilization of contaminated soils in postindustrial areas. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(2), 311. <https://doi.org/10.3390/ijerph15020311>
- Rahman, S. U., Qin, A., Zain, M., Mushtaq, Z., Mehmood, F., Riaz, L., ... & Shehzad, M. (2024). Pb uptake, accumulation, and translocation in plants: Plant physiological, biochemical, and molecular response: A review. *Heliyon*, 10(6).
- Rodriguez, E., da Conceição Santos, M., Azevedo, R., Correia, C., Moutinho-Pereira, J., Ferreira de Oliveira, J. M. P., & Dias, M. C. (2015). Photosynthesis light-independent reactions are sensitive biomarkers to monitor lead phytotoxicity in a Pb-tolerant *Pisum sativum* cultivar. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 574–585. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3208-2>
- Rodriguez-Gomez, D., Garate-Velez, L., Morales-Piña, A. L., Gutiérrez-Rojas, M., & Velasco-Alvarez, N. (2020). Increase in the mortality of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* due to

the application of an electric field during conidiation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(Suppl. 1), 123–133. <https://doi.org/10.24275/rmiq/BIO335>

Rojas, C. (2014). *Mecanismos de tolerancia relacionados con la bioacumulación de plomo por Dodonaea viscosa* (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma Metropolitana, BINDANI.

Rojas-Loria, C. C., Favela-Torres, E., González-Márquez, H., & Volke-Sepúlveda, T. L. (2014). Role of glutathione and glutathione S-transferase in lead tolerance and bioaccumulation by *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(9), 2501–2510. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1604-4>

Rzedowski, G. C., & Rzedowski, J. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México* (2a ed.). Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

Safavi, S. A., Shah, F. A., Pakdel, A. K., Reza Rasoulia, G., Bandani, A. R., & Butt, T. M. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*, 270(1), 116–123.

Sánchez-Castro, I., Molina, L., Prieto-Fernández, M. Á., & Segura, A. (2023). Past, present and future trends in the remediation of heavy-metal contaminated soil-Remediation techniques applied in real soil-contamination events. *Heliyon*, 9(6).

Shahabivand, S., Tayebnia, V., & Aliloo, A. A. (2019). Impact of endophyte fungus *Serendipita indica* on fungus-assisted phyto-stabilization and performance of *Carthamus tinctorius* in a lead polluted soil. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 31(4), 838–851. <https://doi.org/10.1007/s10265-019-01135-0>

Shahid, M., Khalid, S., Abbas, G., et al. (2015). Heavy metal stress and crop productivity. In K. R. Hakeem (Ed.), *Crop production and global environmental issues* (pp. 1–25). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-11543-1_1

Shakeel, T., Shah, G. M., Zeb, B. S., Gul, I., Bibi, S., Hussain, Z., & Irshad, M. (2024). Phytoremediation potential and vegetation assessment of plant species growing on multi-metals contaminated coal mining site. *Environmental Research Communications*, 6(5), 055006. <https://doi.org/10.1088/2515-7620/ace43e>

Sharma, S. K., Singh, D., Pandey, H., Jatav, R. B., Singh, V., & Pandey, D. (2022). An overview of roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plant. *Antioxidant defense in plants: molecular basis of regulation*, 1–13.

She, P., Song, B., Xing, X. H., Van Loosdrecht, M., & Liu, Z. (2006). Electrolytic stimulation of bacteria *Enterobacter dissolvens* by a direct current. *Biochemical Engineering Journal*, 28(1), 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.05.002>

Sheik, S., & Chandrashekar, K. R. (2018). Fungal endophytes of an endemic plant *Humboldtia brunonis* Wall. of Western Ghats (India) and their antimicrobial and DPPH radical scavenging potentiality. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 18(2), 115–125. <https://doi.org/10.1007/s13596-018-0310-4>

Soltabayeva, A., Ongaltay, A., Omondi, J. O., & Srivastava, S. (2021). Morphological, physiological and molecular markers for salt-stressed plants. *Plants*, 10(2), 243. <https://doi.org/10.3390/plants10020243>

- Srivastava, P., Bolan, N., Casagrande, V., Benjamin, J., Adejumo, S. A., Sabir, M., Farooqi, Z. U. R., & Sarkar, A. (2022). Lead in soils: Sources, bioavailability, plant uptake, and remediation. En V. Kumar, A. Sharma, & R. Setia (Eds.), *Appraisal of Metal(loid)s in the Ecosystem* (pp. 331–360). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-90315-5_14
- Suárez-Vergel, G., Figueroa-Martínez, F., Garza-López, P. M., García-Ortiz, N., & Loera, O. (2021). DOPA-melanin, component and tolerance factor to heat and UV-B radiation in the conidia of two species of *Cordyceps*. *Biocontrol Science and Technology*, 32(4), 437-454. <https://doi.org/10.1080/09583157.2021.2016626>
- Sun, Y., Wang, X. J., Liu, Y. P., Duan, K., Xia, Y., Cai, Q. S., & Lou, L. Q. (2022). Long term application of plant growth-promoting bacterium improved grain weight and reduced arsenic accumulation in rice grain: A comparison of 10 bacteria. *Chemosphere*, 303, 135016. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135016>
- Suryanarayanan, T. S., & Shaanker, R. U. (2021). Can fungal endophytes fasttrack plant adaptations to climate change? *Fungal Ecology*, 50, 101039. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2020.101039>
- Suthar, M., Dufossé, L., & Singh, S. K. (2023). The enigmatic world of fungal melanin: A comprehensive review. *Journal of Fungi*, 9(9), 891. <https://doi.org/10.3390/jof9090891>
- Talebi, M., Tabatabaei, B. E. S., & Akbarzadeh, H. (2019). Hyperaccumulation of Cu, Zn, Ni, and Cd in *Azolla* species inducing expression of metallothionein and phytochelatin synthase genes. *Chemosphere*, 230, 488–497. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.038>
- Tan, Y. S., Zhang, R. K., Liu, Z. H., Li, B. Z., & Yuan, Y. J. (2022). Microbial adaptation to enhance stress tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 13, 888746. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.888746>
- Tian, T., Ali, B., Qin, Y., Malik, Z., Gill, R. A., Ali, S., & Zhou, W. (2014). Alleviation of lead toxicity by 5-aminolevulinic acid is related to elevated growth, photosynthesis, and suppressed ultrastructural damages in oilseed rape. *BioMed research international*, 2014(1), 530642.
- Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A., & Aronsson, A. C. (2017). Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 8, 49. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00049>
- Uzma, F., Mohan, C. D., Siddaiah, C. N., & Chowdappa, S. (2019). Endophytic fungi: promising source of novel bioactive compounds. In *Advances in endophytic fungal research: present status and future challenges* (pp. 243-265). Cham: Springer International Publishing.
- Valle, A., Zanardini, E., Abbruscato, P., Argenzio, P., Lustrato, G., Ranalli, G., & Sorlini, C. (2007). Effects of low electric current (LEC) treatment on pure bacterial cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 1376–1385. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03352.x>
- Vandenkoornhuysen, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1196–1206. <https://doi.org/10.1111/nph.13312>
- Vázquez-García, A., Santiago-Martínez, G., & Estrada-Torres, A. (2002). Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica*, 73(1), 1–15.
- Velasco-Alvarez, N., González, I., Damian-Matsumura, P., & Gutiérrez-Rojas, M. (2011). Enhanced hexadecane degradation and low biomass production by *Aspergillus niger* exposed to an electric

current in a model system. *Bioresource Technology*, 102(2), 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.076>

Velasco-Alvarez, N., Gutiérrez-Rojas, M., & González, I. (2017). Alterations in *Aspergillus brasiliensis* (niger) ATCC 9642 membranes associated to metabolism modifications during application of low-intensity electric current. *Bioelectrochemistry*, 118, 1-7.

Verghese, J., Abrams, J., Wang, Y., & Morano, K. A. (2012). Biology of the heat shock response and protein chaperones: Budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 115–158. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05018-11>

Verma, S., & Kuila, A. (2019). Bioremediation of heavy metals by microbial process. *Environmental Technology & Innovation*, 14, 100369.

Xia, Q., Green, B. D., Zhu, Z., Li, Y., Gharibzahedi, S. M. T., Roohinejad, S., & Barba, F. J. (2019). Innovative processing techniques for altering the physicochemical properties of wholegrain brown rice (*Oryza sativa* L.) – Opportunities for enhancing food quality and health attributes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(20), 3349–3370. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1499283>

Xie, L., Hao, P., Cheng, Y., Ahmed, I. M., & Cao, F. (2018). Effect of combined application of lead, cadmium, chromium and copper on grain, leaf and stem heavy metal contents at different growth stages in rice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.017>

Xiong, L., Wang, R. G., Mao, G., & Koczan, J. M. (2006). Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. *Plant physiology*, 142(3), 1065-1074.

Yadava, K. K., Gupta, N., Kumar, A., Reece, L. M., Singh, N., Rezaia, S., & Khan, S. A. (2018). Mechanistic understanding and holistic approach of phytoremediation: A review on application and future prospects. *Ecological Engineering*, 120, 274–298. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.05.039>

Yang, N., Zhang, W., Wang, D., Cao, D., Cao, Y., He, W., ... & Wei, X. (2023). A novel endophytic fungus strain of *Cladosporium*: Its identification, genomic analysis, and effects on plant growth. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1287582. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1287582>

Yang, Y. R., Han, X. Z., Liang, Y., Ghosh, A., Chen, J., & Tang, M. (2015). The combined effects of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and lead (Pb) stress on Pb accumulation, plant growth parameters, photosynthesis, and antioxidant enzymes in *Robinia pseudoacacia* L. *PLoS ONE*, 10(12), e0145726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145726>

Yu, Y., Teng, Z., Mou, Z., Lv, Y., Li, T., Chen, S., Zhao, D., & Zhao, Z. (2021). Melatonin confers heavy metal-induced tolerance by alleviating oxidative stress and reducing the heavy metal accumulation in *Exophiala pisciphila*, a dark septate endophyte (DSE). *BMC Microbiology*, 21, 40. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02093-1>

Zhan, F., He, Y., Zu, Y., Li, T., & Zhao, Z. (2011). Characterization of melanin isolated from a dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(10), 2483-2489.

Zhang, F. Q., Wang, Y. S., Lou, Z. P., & Dong, J. D. (2007). Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings

(*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). *Chemosphere*, 67(1), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.007>

Zhang, L., Hao, N., Li, W., Zhang, B., Shi, T., Xie, M., & Yu, M. (2022). Effect of ultrasonic induction on the main physiological and biochemical indicators and γ -aminobutyric acid content of maize during germination. *Foods*, 11(9), 1358. <https://doi.org/10.3390/foods11091358>

Zhang, S., Zhang, C., Gao, Z. F., Qiu, C. W., Shi, S. H., Chen, Z. H., Ali M. A., Wang F. & Wu, F. (2023). Integrated physiological and omics analyses reveal the mechanism of beneficial fungal *Trichoderma* sp. alleviating cadmium toxicity in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 267, 115631. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115631>

Zhang, Y., Xu, J., Li, R., Ge, Y., Li, Y., & Li, R. (2023). Plants' response to abiotic stress: Mechanisms and strategies. *International journal of molecular sciences*, 24(13), 10915.

Zheng, J., Xie, X., Li, C., Wang, H., Yu, Y., & Huang, B. (2023). Regulation mechanism of plant response to heavy metal stress mediated by endophytic fungi. *International Journal of Phytoremediation*, 25(12), 1596-1613.

Zhu, L., Li, T., Wang, C., Zhang, X., Xu, L., Xu, R., & Zhao, Z. (2018). The effects of dark septate endophyte (DSE) inoculation on tomato seedlings under Zn and Cd stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(35), 35232–35241. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3369-z>

Zhu, N., Zhang, B., & Yu, Q. (2020). Genetic engineering-facilitated coassembly of synthetic bacterial cells and magnetic nanoparticles for efficient heavy metal removal. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(20), 22948–22957. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c05543>

Zimmermann, U., Schulz, J., & Pilwat, G. (1973). Transcellular ion flow in *Escherichia coli* B and electrical sizing of bacterias. *Biophysical Journal*, 13(10), 1005–1013. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(73\)86030-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(73)86030-1)

Zituni, D., Schutt-Gerowitt, H., Kopp, M., Kronke, M., Addicks, K., Hoffmann, C., Hellmich, M., Faber, F., & Niedermeier, W. (2014). The growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in low-direct current electric fields. *International Journal of Oral Science*, 6(1), 7–14. <https://doi.org/10.1038/ijos.2014.3>

Zulfiqar, U., Farooq, M., Hussain, S., Maqsood, M., Hussain, M., Ishfaq, M., ... & Rehman, A. (2019). Lead toxicity in plants: Impacts and remediation. *Journal of Environmental Management*, 250, 109557. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109557>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00325

Matrícula: 2223801814

Influencia de un hongo endófito tratado electroquímicamente sobre el crecimiento de *Dodonaea viscosa* y su tolerancia al plomo.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 23 del mes de septiembre del año 2025 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL
DRA. MARIA AURORA MARTINEZ TRUJILLO
DR. CESAR CUAHUTEMOC ROJAS LORIA
DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPULVEDA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

DE: MAURICIO RUEDA GONZALEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

MAURICIO RUEDA GONZALEZ
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

VOCAL

DRA. MARIA AURORA MARTINEZ TRUJILLO

VOCAL

DR. CESAR CUAHUTEMOC ROJAS LORIA

SECRETARIA

DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPULVEDA