

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA



CASA ABIERTA AL TIEMPO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE FITORREMEDIACIÓN DE
Festuca arundinacea EN INTERACCIÓN CON UN HONGO
FILAMENTOSO EN PRESENCIA DE HIDROCARBUROS**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

M. en B. ARELI CRUZ HERNÁNDEZ

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

DIRECTOR

Dra. Araceli Tomasini Campocosio

ASESORA

Dra. Laura Josefina Pérez Flores

ASESORA

MÉXICO, D.F.

MAYO 2013

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”

México, D. F. a 22 de Mayo del 2013

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

**Estudio de los mecanismos de fitorremediación de *Festuca arundinacea* en interacción
con un hongo filamentoso en presencia de hidrocarburos.**

Que presentó

M. en B. Areli Cruz Hernández

Comité Tutorial:

Director: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
Asesor: Dra. Araceli Tomasini Campocosio
Asesor: Dra. Laura Josefina Pérez Flores

Jurado:

Presidente:

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Secretario:

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa Dr. Francisco José Fernández Perrino

Vocal:

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa Dra. Laura Josefina Pérez lores

Vocal:

CEPROBI-IPN -Yautepec, Morelos. Dr. Mario Rodríguez Monroy

DEDICATORIA

Me siento sumamente afortunada de contar con una familia que son un ejemplo de unión y apoyo. Dedicado a mi adorada familia:

Mi mamá, el mayor apoyo, confidente, cómplice y mi mejor amiga de éstas y otras vidas. Que nunca dudó ni un segundo de mis sueños, impulsándome día a día con sus palabras que me levantaban el ánimo en mis peores momentos.

Mi papá, mi primer maestro en la escuela de la vida que se fue convirtiendo en mi principal ejemplo de vida, estrella que alumbró mi camino y el pilar que siempre me sostiene.

Mi esposo, amor, cariño, apoyo y confianza, son características que lo definen. Es la persona que desde hace tres años y siete meses para ser exactos al día de hoy (17 de mayo del 2013) decidió compartir conmigo sus sueños y todo lo que implica vivir... siempre será el amor y hombre de mi vida.

Mi hermano Francisco, ejemplo de dedicación y disciplina, siempre luchando por conseguir sus ideales.

Mi hermano Miguel, inteligente y muy valiente, siempre fue y será el hermano mayor que está para consentir a su hermana chiquita.

Mi hermana Olga, mi ejemplo de carácter pero a la vez de inocencia. Por cuidarme y consentirme, pero sobre todo por darle a mis padres una razón más para vivir, mi Arlet.

Mi hermana Arisbel, por ser mi ejemplo de creatividad y organización. Siempre recordándome que el verdadero apoyo está en la familia.

Mi hermana Elia, ejemplo de serenidad, originalidad y paciencia. Admiro como se desvive por nuestros padres.

Mi hermano Jony, ejemplo de esperanza, por ser un gran amigo y darme el orgullo de ser su madrina. Nunca dejará de ser mi hermanito.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Instituto Mexicano del Petróleo por las becas otorgadas durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Araceli Tomasini, a la Dra. Laura Pérez y al Dr. Francisco J. Fernández por sus consejos durante la parte experimental y la escritura de la tesis.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Residuos Sólidos; Asma, Caliope, Blanca, Nemi, Néstor, Víctor, José Luis y Bety.

Con especial cariño y admiración al Dr. Mariano Gutiérrez por todo su apoyo, consejos y dirección. Por enseñarme aprender, pero sobre todo por su invaluable amistad y afecto que me han permitido vivir una estupenda etapa de mi vida profesional.

También quiero agradecer a Miriam, Marlet, Juan Carlos y Cesar (*mi amigui*). Mis grandes amigos que me han apoyado con sus consejos y alentadores comentarios, compartiendo este reto conmigo.

RESUMEN

La fitorremediación utiliza procesos biológicos con plantas para remover, degradar, transformar o estabilizar contaminantes. Los microorganismos benéficos asociados a la rizosfera de las plantas favorecen la eficiencia de la fitorremediación. Sin embargo, el papel e importancia de los microorganismos en la remoción de contaminantes orgánicos por las interacciones planta-microorganismo no están completamente esclarecidos. En el presente trabajo, se evaluó la capacidad de un hongo endófito transmitido vía semilla (identificado como *Lewia* sp. ACH-4) para mineralizar hidrocarburos, analizándose su efecto sobre el crecimiento, remoción y acumulación de hidrocarburos en *Festuca arundinacea* sobre suelo modelo (agrolita) y suelo contaminado artificialmente. Se utilizó una mezcla de hidrocarburos (MHC), constituida por dos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP): fenantreno (PHE) y pireno (PYR), y un alifático: hexadecano (HXD). La concentración inicial de MHC fue 1500 mg kg^{-1} . Los experimentos se llevaron a cabo en el invernadero de la UAM-I durante 45 días. Las plantas inoculadas y no inoculadas se cultivaron en unidades experimentales (frascos de vidrio oscuros cilíndricos) con suelo modelo (40 g) o suelo (400 g). Para evaluar la supervivencia y efectividad en la remoción de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) de la interacción *Festuca arundinacea*-*Lewia* sp., bajo condiciones experimentales de campo (4 Ton de suelo contaminado, con un tratamiento de remediación previo, provenientes de la Ex. Refinería 18 de Marzo de PEMEX), se desarrolló un experimento final que se mantuvo en observación durante 1.5 años. Al inocular con *Lewia* sp. se estimuló (100%) el crecimiento de las raíces de *F. arundinacea* en suelo modelo contaminado. La remoción de hidrocarburos fue mayor ($25 \pm 7.8\%$) en los suelos plantados que en los suelos sin plantar. La eficiencia de remoción de PYR fue significativamente diferente entre las plantas inoculadas (97.9%) y no inoculadas (91.4%) después de 45 días de crecimiento en suelo. Mientras, en el suelo modelo, la remoción de PYR fue 37 veces mayor con las plantas inoculadas que la obtenida con plantas no inoculadas. Nuestros resultados demuestran que *Lewia* sp. favorece la eficiencia de remoción de HAP por *F. arundinacea*, tanto en suelo modelo como en suelo, por lo que puede ser considerado como un hongo rizerremediador benéfico. La acumulación de PYR en raíces fue promovida significativamente después de 45 días de crecimiento en suelo modelo y suelo (318 y 1603.4 mg kg^{-1} de raíces en base seca, respectivamente). Los mecanismos de

fitorremediación estimulados por la interacción *F. arundinacea* - *Lewia* sp., fueron fitodegradación y rizodegradación. La supervivencia de *F. arundinacea* fue mayor (40%) en comparación con las plantas inoculadas con *Lewia* sp. (30%) cuando se sembró en suelo de la Ex. Refinería 18 de marzo (previamente remediado por empresas contratadas por PEMEX), bajo condiciones de campo. A los 120 días de cultivo las plantas inoculadas estaban más vigorosas y sanas que las no inoculadas. Finalmente, no se observaron diferencias significativas en la remoción de HTP por *F. arundinacea* inoculada y no inoculada con *Lewia* sp.

Palabras clave: hongo filamentoso transmitido vía semillas; hongo endófito; *Lewia* sp.; hidrocarburos aromáticos policíclicos; *Festuca arundinacea*.

ABSTRACT

Phytoremediation utilizes biological process to remove, degrade, transform or stabilize contaminants. Beneficial microorganisms associated with the rhizosphere of plants enhanced the phytoremediation efficiency. Nevertheless, the role and importance of microorganism in organic contaminant removal by plant-microbe interaction are not completely understood. In this work, the ability of an endophyte fungus (identified as *Lewia* sp. ACH-4) for mineralizing hydrocarbons and the effect on growth, and hydrocarbon accumulation and removal by *Festuca arundinacea* growing on artificially contaminated model soil (perlite) and soil were evaluated. A hydrocarbon mixture of two polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), phenanthrene (PHE) and pyrene (PYR), blended with an aliphatic hydrocarbon, hexadecane (HXD), was used. The initial HM concentration was 1500 mg kg⁻¹. Greenhouse experiments were carried out for 45 days. Inoculated and non-inoculated plants were grown in dark cylindrical glass pots with model soil (40 g) or soil (400 g). A final 1.5-year experiment was performed in order to evaluate both survival and effectiveness for removal of total petroleum hydrocarbons of the *Festuca arundinacea*-*Lewia* sp. interaction, under field experimental conditions (4 ton of contaminated, previously remediated soil, obtained from the former Refinery 18 de Marzo, PEMEX). Inoculation with *Lewia* sp., a seed-borne endophyte fungus, stimulated (100%) root growth of *F. arundinacea* in contaminated model soil. Hydrocarbon removal was greater in planted than in unplanted assays. PYR removal efficiency for inoculated (97.9%) and non-inoculated (91.4%) plants was significantly different after 45 days of growth in soil; whilst in model soil, PYR removal was 37-fold higher with inoculated plants than with non-inoculated plants. Our results demonstrate that *Lewia* sp. improved the efficiency of PAH removal by *F. arundinacea*, for both model soil and soil, for this reason *Lewia* sp., could be considered a beneficial rhizoremediator. Root accumulation of PYR was promoted after 45 days of growth in model soil and soil, 318 y 1603.4 mg kg⁻¹ of dry roots, respectively. Phytoremediation mechanisms stimulated by interaction *F. arundinacea*-*Lewia* sp. were phytodegradation and rizodegradation. Survival of non-inoculated *F. arundinacea* growing in ex-refinery March 18 soil (previously remediated), under field conditions, was higher (40%) compared to plants inoculated with *Lewia* sp. (30%). Inoculated plants were healthy compared with non-inoculated plants after 120 days. Finally, there were not significant

differences in the total petroleum hydrocarbon removal between *Festuca arundinacea* inoculated with *Lewia* sp. and non-inoculated *F. arundinacea*.

Keywords: Seed-borne filamentous fungus; endophytic fungus; *Lewia* sp.; Polycyclic aromatic hydrocarbons; *Festuca arundinacea*.

ABREVIATURAS

DCM	Diclorometano
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Etilendiamin tetracetato disódico
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HTP	Hidrocarburos totales del petróleo
HXD	Hexadecano
ITS	Internal transcribed spacers
MHC	Mezcla de hidrocarburos
MS	Medio Murashige and Skoog
NOM	Norma Oficial Mexicana
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar papa dextrosa
PHE	Fenantreno
PYR	Pireno
TAE	Solución compuesta por base tris, ácido acético y EDTA
UAM-I	Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa
US EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica

INDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	17
1.1 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	17
1.1.1 <i>Propiedades físico-químicas de los HAP</i>	17
1.1.2 <i>Formación de los HAP</i>	19
1.1.3 <i>Efectos tóxicos de los HAP</i>	19
1.1.4 <i>Metabolismo de HAP en hongos</i>	20
1.1.5 <i>Metabolismo de HAP en las plantas</i>	23
1.2 FITORREMEDIACIÓN	24
1.2.1 <i>Concepto de fitorremediación</i>	24
1.2.2 <i>Ventajas y desventajas de la fitorremediación</i>	24
1.2.3 <i>Mecanismos de fitorremediación</i>	26
1.2.4 <i>Planta fitorremediadora</i>	30
1.4 HONGOS ENDÓFITOS.....	31
1.4.1 <i>Aislamiento</i>	31
1.4.2 <i>Cultivo e identificación</i>	32
1.4.3 <i>Reproducción y colonización</i>	33
1.5 INTERACCIÓN PLANTA-MICROORGANISMO PARA FINES DE FITORREMEDIACIÓN.....	34
1.6 INTERACCIÓN PLANTA-HONGO ENDÓFITO.....	35
2. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	38
3. HIPÓTESIS	39
4. OBJETIVOS.....	39
4.1 GENERAL.....	39
4.2 ESPECÍFICOS	39
5. MATERIALES Y MÉTODOS	40
5.1 PLANTA	40
5.2 HONGO.....	40
5.3 SUELO	40
5.3.1 <i>Suelo libre de contaminantes</i>	40
5.3.2 <i>Suelo modelo</i>	40
5.3.3 <i>Suelo con hidrocarburos totales del petróleo</i>	41
5.4 HIDROCARBUROS	41
5.5 CULTIVO DE LA PLANTA	41

5.5.1 Esterilización superficial de las semillas	41
5.5.2 Medio de cultivo	42
5.5.3 Tubos de cultivo.....	42
5.5.4 Germinación y crecimiento de <i>F. arundinacea</i>	42
5.6 CULTIVO DEL HONGO FILAMENTOSO	43
5.6.1 Método de aislamiento del hongo filamentoso	43
5.6.2 Método de conservación.....	43
5.6.3 Preparación de la suspensión de micelio.....	43
5.7 EXPERIMENTOS SIN HIDROCARBUROS	44
5.7.1 Prueba de endofiticidad.....	44
5.7.2 Prueba de fitopatogenicidad y cortes transversales de raíces.....	44
5.8 EXPERIMENTOS CON HIDROCARBUROS	45
5.8.1 Contaminación del suelo modelo y suelo	45
5.8.2 Hongo filamentoso.....	45
5.8.3 Interacción planta – hongo filamentoso.....	45
5.9 MÉTODOS ANALÍTICOS	47
5.9.1 Identificación del hongo filamentoso	47
5.9.2 Evaluación del crecimiento de la planta.....	49
5.9.3 Extracción de hidrocarburos en la planta.....	50
5.9.4 Extracción de hidrocarburos residuales en suelo modelo y suelo.	50
5.9.5 Método de cuantificación de hidrocarburos.....	51
5.9.6 Cuantificación del CO ₂ producido por el hongo filamentoso.....	51
5.9.7 Cuantificación de la supervivencia de <i>F. arundinacea</i>	51
5.9.8 Análisis de los datos.....	51
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
6.1 HONGO.....	52
6.1.1 Aislamiento y prueba de endofiticidad.....	52
6.1.2 Respuestas fitopatógenas	54
6.1.3 Identificación del hongo.....	56
6.1.4 Evaluación de la capacidad de <i>Lewia sp.</i> , para remover y mineralizar hidrocarburos.....	59
6.2 PLANTA-HONGO.....	61
6.2.1 Respuesta fenológica	61
6.2.2 Remoción de hidrocarburos	64
6.2.3 Destino final de hidrocarburos.....	66
6.2.4 Crecimiento de <i>Festuca arundinacea</i> - <i>Lewia sp.</i> en suelo con hidrocarburos totales del petróleo 68	
6.2.5 Remoción de hidrocarburos totales del petróleo por la interacción <i>F. arundinacea</i> - <i>Lewia sp.</i> ..	70

7. CONCLUSIONES	72
8. RECOMENDACIONES.....	74
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
APÉNDICE I.....	84
APÉNDICE II.....	87
APÉNDICE III	98

INTRODUCCIÓN

La contaminación de suelos con hidrocarburos derivados del petróleo es un problema que se ha extendido en la actualidad, como resultado de derrames de contenedores, rupturas en tuberías subterráneas y distintos procesos industriales. Entre los componentes del petróleo, considerados contaminantes persistentes, se identifica a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP): compuestos formados por dos o más anillos aromáticos fusionados, constituidos por átomos de carbono e hidrógeno, químicamente estables a temperatura ambiente. Los HAP son resultado de la combustión incompleta de materiales como materia orgánica, gasolinas y carburantes de los motores de vehículos, humo de tabaco, carbón y madera; o como producto de incendios forestales y quemas agrícolas, incineración de residuos, refinación de petróleo, producción de asfalto y aluminio (Srogi, 2007). Debido a sus estructuras hidrofóbicas son casi o totalmente insolubles en agua. Su solubilidad en agua, además, disminuye a medida que aumenta su peso molecular. Debido a que son altamente hidrofóbicos, se encuentran fundamentalmente en aire, agua, suelo y vegetación, aunque un inventario preliminar de HAP en el ambiente de Reino Unido mostró que el suelo es el principal depósito de estos contaminantes (Gan y col., 2009). Los suelos contaminados con HAP presentan riesgos potenciales para la salud humana y para los ecosistemas naturales, porque algunos HAP se han reportado como carcinogénicos, citotóxicos o ecotóxicos (Srogi, 2007). Por lo tanto, es de vital importancia promover su eliminación, preferentemente por la vía de su biodegradación. Recientemente, el interés por desarrollar estrategias de remediación *in situ* de contaminantes ambientales con HAP se ha incrementado de manera considerable (Ho y Banks, 2006; Gan y col., 2009; Ndimele, 2010). Una alternativa biológica, amigable con el ambiente, que recientemente ha recibido mucha atención es la fitorremediación o uso de vegetales para remediar sitios contaminados. La fitorremediación constituye un grupo de tecnologías innovadoras que aprovecha las plantas y los procesos naturales para remediar o estabilizar residuos peligrosos en suelos, sedimentos, aguas superficiales o subterráneas (Ndimele, 2010). En los últimos cinco años, los estudios relacionados con el uso de fitorremediación para restaurar ambientes contaminados con HAP han aumentado de aproximadamente 448 publicaciones en 2008 hasta llegar a más de 1100 en 2013 (base de datos Scopus). Este conjunto de tecnologías es económico y eficaz para disminuir los contaminantes en el

suelo. Se conocen tres posibles mecanismos que contribuyen a la fitorremediación de contaminantes orgánicos: (i) la fitovolatilización; se refiere a la evaporación, a través de la transpiración de las plantas, de aquellos contaminantes volátiles absorbidos por las raíces, (ii) la fitodegradación; en la que después de la absorción de contaminantes por las raíces de las plantas se lleva a cabo el metabolismo de los mismos y (iii) la fitoestimulación o rizodegradación; en este mecanismo las plantas, por medio de la producción de exudados radiculares, promueven el crecimiento de microorganismos y así la sucesiva degradación o transformación de contaminantes por la comunidad microbiana asociada a la rizosfera (Pilon-Smits, 2005; Lazcano y col., 2010). La familia de las gramíneas es una de las más importantes para la fitorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos como los HAP e hidrocarburos del petróleo (Gawronski y Gawronska, 2007); *Festuca arundinacea* es una gramínea constantemente utilizada en estudios de fitorremediación de suelos contaminados con HAP (Siciliano y col., 2003; Xiao y col., 2004; Cheema y col., 2009; Soleimani y col., 2010a) y como testigo en estudios de fitorremediación *in vitro* (Reynoso-Cuevas y col., 2008). Por otro lado, se conoce una gran variedad de microorganismos rizosféricos que han sido investigados para degradar exitosamente hidrocarburos del petróleo, los hongos filamentosos entre ellos. Estudios recientes de fitorremediación sugieren que los hongos endófitos juegan un papel importante en este proceso (Mohsenzadeh y col., 2010; Soleimani y col., 2010a). Los hongos endófitos se definen como microorganismos que colonizan los tejidos internos de una planta sin causar algún daño negativo inmediato (Kuldau y Bacon, 2008). Estos hongos se benefician de la asociación simbiótica mediante el suministro de nutrientes por los exudados de las raíces, mientras que las plantas se benefician por un incremento de la absorción de nutrientes y protección contra estrés biótico y abiótico, por ejemplo, mediante la reducción de la toxicidad de los contaminantes del suelo (Tanaka y col., 2012). En este trabajo, se evaluó el efecto de *Lewia* sp. (un hongo filamentoso transmitido vía semillas) como un inóculo exógeno en la remoción de hidrocarburos que contaminan los suelos. Se estudió la remoción de los hidrocarburos en diferentes matrices, así como la acumulación en los tejidos de *Festuca arundinacea*. Se utilizó, además de suelo y suelo con hidrocarburos (previamente remediado), suelo modelo (perlita) con el fin de controlar variables implícitas en el suelo (porosidad, microorganismos nativos y absorción de los contaminantes por la

matriz del suelo, entre otros). El estudio se centró en evaluar las condiciones que promueven el crecimiento de las plantas en el suelo y así acelerar la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos a través de la inoculación selectiva con microorganismos específicos que tienen la capacidad de degradar hidrocarburos.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

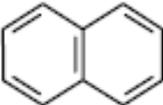
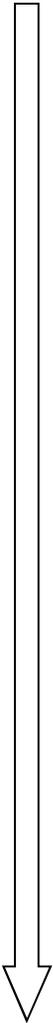
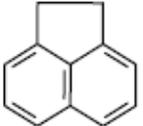
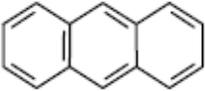
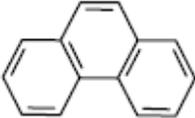
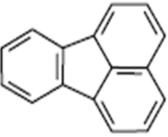
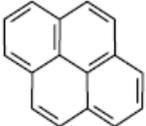
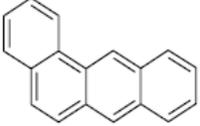
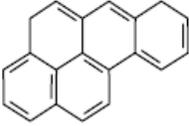
1.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) constituyen un amplio grupo de compuestos orgánicos. Se caracterizan por estar formados por átomos de carbono e hidrógeno. Están constituidos por la unión de dos o más anillos, que contienen cinco o seis átomos de carbono, en arreglos lineales, angulares y en grupo, se pueden encontrar en suelo, sedimentos y dispersos en el aire (Haritash y Kaushik, 2009).

1.1.1 Propiedades físico-químicas de los HAP

Las características físico-químicas de los HAP son muy diversas; algunos de ellos son semivolátiles, se encuentran en forma gaseosa a temperatura ambiente, mientras que otros tienen un elevado punto de ebullición. Debido a su estabilidad a temperatura ambiente y a sus frecuentes estructuras hidrofóbicas, son casi o totalmente insolubles en agua. En general, son lipofílicos porque tienden a unirse a sustancias lipídicas y/o disolverse en ellas. Este carácter lipofílico de los HAP se incrementa con la complejidad de los compuestos y la masa molecular, es decir, su afinidad es mayor por las grasas cuando más átomos y más anillos forman la molécula del HAP. Son inestables fotoquímicamente (se degradan por la luz). En la Tabla 1 se muestran algunas propiedades que caracterizan este grupo de moléculas. Una característica importante de los HAP de alto peso molecular es su efecto recalcitrante. Los contaminantes recalcitrantes persisten mucho tiempo en la biosfera sin alterarse porque tienen una estructura química muy estable, por lo que resisten al ataque de los microorganismos o de cualquier mecanismo de degradación, sea biológico o químico. A pesar del efecto recalcitrante de algunos HAP, hay estudios que demuestran que pueden ser metabolizados por algunos microorganismos, incluyéndose a los hongos filamentosos (Haritash y Kaushik, 2009).

Tabla 1. Estructura, solubilidad y efecto recalcitrante de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos utilizados como modelo de estudio.

HAP	Estructura	Solubilidad (mg L ⁻¹)	Efecto Recalcitrante*
Naftaleno		31.7	
Acenafteno		3.9	
Antraceno		0.07	
Fenantreno		1.3	
Fluorantreno		0.26	
Pireno		0.14	
Benzo(a)antraceno		0.002	
Benzo(a)pireno		0.003	

*La dirección de la flecha indica cómo aumenta el efecto recalcitrante.

1.1.2 Formación de los HAP

En el proceso de combustión de la materia orgánica, la combustión es incompleta si no hay suficiente oxígeno: parte del combustible no reacciona completamente con el oxígeno y se forman otros subproductos. Los HAP son moléculas lipofílicas producto de la combustión incompleta del carbón, aceites, gases, madera, residuos domésticos y, en general, sustancias de origen orgánico. La tasa de formación de los HAP depende de las condiciones de la combustión: si ésta genera mucho humo negro dará lugar a mayor cantidad de HAP. También se encuentran de forma natural en el petróleo, el carbón, depósitos de alquitrán y como productos de la utilización de combustibles, ya sean fósiles o biomasa, y de la actividad volcánica (Beyer y col., 2010). Debido a que son altamente hidrofóbicos, se encuentran en todo el ambiente, son fácilmente absorbidos por partículas sólidas de materia orgánica, formando micro-contaminantes en el ambiente. Aire, agua, suelo y vegetación actúan como ambientes de almacenaje de HAP, aunque un inventario preliminar de HAP en el ambiente del Reino Unido mostró que el suelo es el principal depósito de estos contaminantes (Gan y col., 2009).

1.1.3 Efectos tóxicos de los HAP

Algunos HAP de bajo y, principalmente, los de alto peso molecular son contaminantes altamente peligrosos considerados tóxicos, mutagénicos o carcinogénicos. En la Tabla 2 se enlistan 28 HAP que recientemente han sido identificados como contaminantes peligrosos por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (US EPA, 2008). La toxicidad de los HAP depende principalmente de la estructura del compuesto, incluso algunos isómeros con el mismo número de anillos pueden variar de no tóxico a extremadamente tóxico dependiendo de las diferentes posiciones estéricas de los anillos bencénicos. La biotransformación enzimática también determina la toxicidad de los HAP y los organismos con baja capacidad para biotransformarlos son más vulnerables a los HAP peligrosos. Por ejemplo, en los peces los HAP pueden metabolizarse para formar metabolitos, los cuales subsecuentemente pueden unirse covalentemente a macromoléculas celulares, como DNA, RNA y proteínas. Pero al no tener desarrollado un sistema de reparación de DNA, se pueden producir varias lesiones y condiciones adversas en las células y el organismo, dando como resultado peces con tumores, pérdida de crecimiento,

reducción de supervivencia y un incremento en el desarrollo de malformaciones (Beyer y col., 2010).

Tabla 2. HAP identificados como contaminantes peligrosos por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (US EPA)

Número*	HAP	Número de anillos
1	Benzo(a)antraceno	4
2	Criseno	4
3	Benzo(a)pireno	5
4	Benzo(b)fluoranteno	5
5	Benzo(j)fluoranteno	5
6	Benzo(k)fluoranteno	5
7	Fluoranteno	4
8	Benzo(r,s,t)pentafeno	6
9	Dibenz(a,h)acridino	5
10	Dibenz(a,j)acridino	5
11	Dibenzo(a,h)antraceno	5
12	Dibenzo(a,e)fluoranteno	6
13	Dibenzo(a,e)pireno	6
14	Dibenzo(a,h)pireno	6
15	Dibenzo(a,l)pireno	6
16	7H-Dibenzo(c,g)carbazole	5
17	7-12-Dimetilbenz(a)antraceno	4
18	Indeno(1,2,3-cd)pireno	6
19	3-Metilclorantreno	4
20	5-Metilcriseno	4
21	1-Nitropireno	4
22	Acenafteno	3
23	Acenaftileno	3
24	Antraceno	3
25	Benzo(g,h,i)perileno	6
26	Fluoreno	3
27	Fenantreno	3
28	Pireno	4

*Compuestos enumerados 1-21 están reportados en el inventario de tóxicos de la *US EPA National Waste Minimisation Programme*, mientras que 22-28 en la lista de *US EPA Priority Chemical List*.

1.1.4 Metabolismo de HAP en hongos

La biodegradación de los HAP por hongos y otros microorganismos ha sido estudiada y revisada ampliamente en los últimos años (Muckian y col., 2007; Acevedo y col., 2010;

Wang y col., 2012). La mayoría de los hongos no pueden utilizar los HAP como única fuente de carbono y energía, pero pueden co-metabolizar HAP y generar una amplia variedad de productos, y en algunos casos degradarlos hasta CO₂ y agua (mineralización). Se conocen dos tipos de metabolismo fúngico de HAP: para hongos no-ligninolíticos y para ligninolíticos (también conocidos como hongos de pudrición blanca). La mayoría de los hongos son no-ligninolíticos, ya que no crecen en la madera, y por lo tanto, no tienen necesidad de producir las enzimas peroxidasas, como lignina, manganeso y glioxal peroxidasas (enzimas producidas por los hongos ligninolíticos). Como se muestra en la Figura 1, el primer paso en el metabolismo de los HAP en la mayoría de los principales grupos de hongos no-ligninolíticos (incluyendo zigomicetos, hifomicetos, ascomicetos-grupo al que pertenece *Lewia* sp. y otros) es oxidar un anillo aromático para producir un óxido de areno mediante la reacción catalizada por la enzima citocromo P-450 monoxigenasa. Esta ruta es similar al metabolismo de HAP en los mamíferos. En comparación con la oxidación del anillo aromático por enzimas dioxigenasas para formar *cis*-dihidrodiol, la enzima monoxigenasa incorpora únicamente un átomo de oxígeno al anillo para formar un óxido de areno. Esta molécula es posteriormente hidratada a través de una reacción catalizada por la epóxido-hidrolasa para formar *trans* dihidrodiol. Además, se pueden producir derivados del fenol a partir de óxidos de areno, por el reordenamiento no enzimático del compuesto, que pueden actuar como sustratos para la posterior sulfatación, metilación o conjugación con glucosa, xilosa o ácido glucurónico. Aunque la mayoría de los hongos no-ligninolíticos no son capaces de mineralizar los HAP, estos HAP transformados son generalmente menos tóxicos y más solubles que sus respectivos compuestos originales (Cerniglia y Sutherland, 2010).

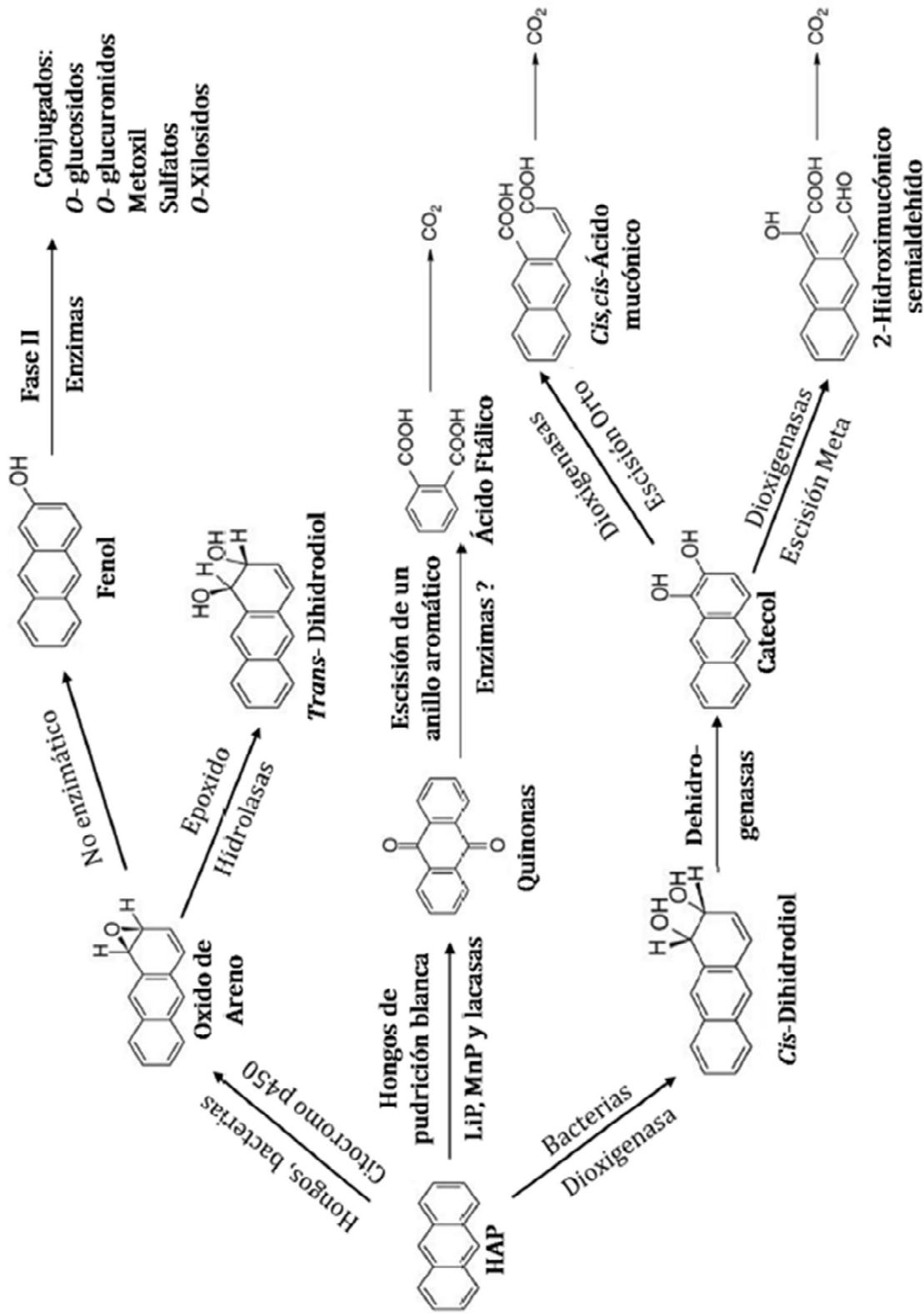


Figura 1. Rutas generales para el metabolismo de HAP por hongos y bacterias.

1.1.5 Metabolismo de HAP en las plantas

El metabolismo de compuestos orgánicos en plantas se lleva a cabo durante la absorción por las raíces y la difusión a través de tallos y hojas de las plantas. La actividad metabólica en plantas incluye la activación o modificación del compuesto (fase I), su conjugación (fase II) y su transporte o excreción (fase III) (Schröder, 2007). En la Figura 2 se muestran las reacciones catalizadas inicialmente por esterasas, P450 monooxigenasas y peroxidasas durante la fase I, para llevar a cabo la activación de los compuestos orgánicos por reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis. En muchos de los casos, la activación es catalizada también por peroxidasas. Sin embargo, las reacciones de oxidación más importantes están reguladas por la enzima citocromo P450 monooxigenasa (que comprende la familia más grande de proteínas de plantas). Las enzimas implicadas en la fase I están localizadas en fracciones de membrana en las células de las plantas (monooxigenasa p450) o en el apoplasto y citosol (peroxidasas). Posteriormente, en la fase II se efectúa la conjugación, realizada por las enzimas glutatión y glucosil transferasa. Finalmente, la fase III ha sido dividida en dos fases independientes, (i) en ella ocurre el transporte y almacenaje de estos conjugados en las vacuolas o (ii) en este caso se siguen transformando los conjugados hasta formar metabolitos solubles o conjugados secundarios, como por ejemplo, residuos que se unen a la pared celular o simplemente son excretados (James y Strand, 2009). Todas las plantas poseen gran cantidad de enzimas requeridas para el metabolismo de contaminantes. Sin embargo, la actividad específica de una enzima para el metabolismo de distintos contaminantes puede no estar disponible en todas las especies de plantas: por ejemplo, la antrazina es sólo detoxificada por el maíz y algunas especies de sorgo, mientras que otras gramíneas no están equipadas con las isoenzimas responsables para detoxificar este tipo de contaminantes (Schröder, 2007).

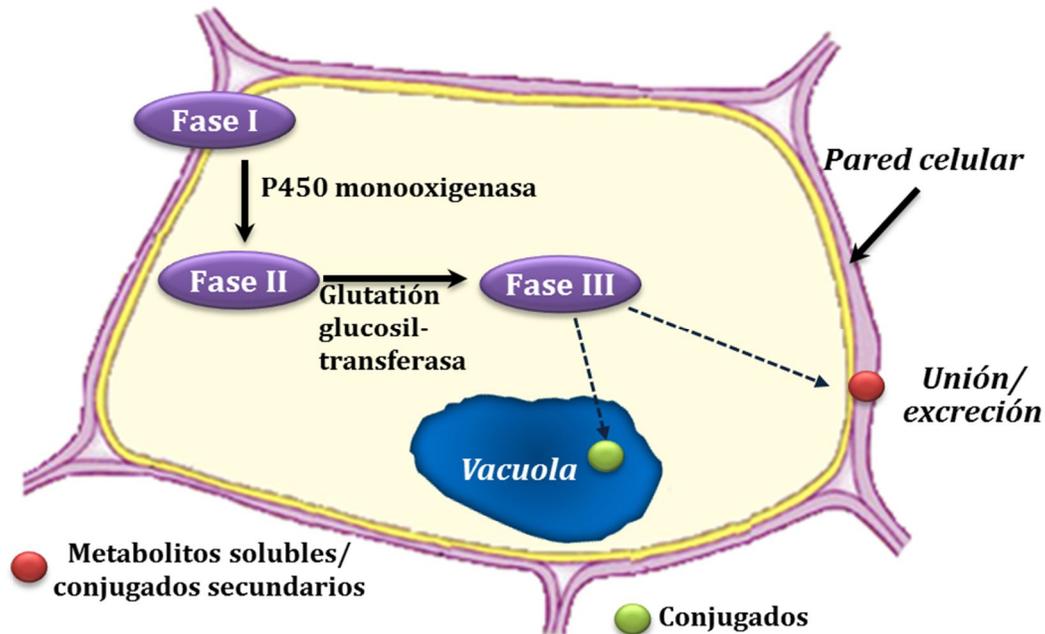


Figura 2. Metabolismo de compuestos orgánicos en plantas.

1.2 Fitorremediación

1.2.1 Concepto de fitorremediación

Fitorremediación viene del griego *phyto*, que significa "planta" y del latín *remedium*, que significa "restablecer el equilibrio". La fitorremediación consiste en mitigar las concentraciones de contaminantes, a través del uso de las plantas, en suelos, agua, sedimentos y aire, con plantas capaces de remover, degradar o estabilizar metales, plaguicidas, solventes, explosivos, hidrocarburos del petróleo y otros contaminantes. Bajo esta perspectiva, este tratamiento de los problemas ambientales se realiza sin necesidad de excavar y disponer del material contaminante en otro lugar. Es una tecnología eficiente para una amplia variedad de contaminantes orgánicos e inorgánicos (Ndimele, 2010).

1.2.2 Ventajas y desventajas de la fitorremediación

La fitorremediación puede ser aplicada a una amplia gama de condiciones ambientales. En comparación con otras tecnologías de remediación, se puede aplicar tanto a contaminantes orgánicos como inorgánicos en suelos, sedimentos, aguas superficiales y aguas subterráneas. Además, en algunos casos se puede aplicar a varias combinaciones de

diferentes tipos de contaminantes y varios medios afectados simultáneamente. Otra de las principales ventajas de la fitorremediación es su bajo costo en comparación con otros métodos de remediación, tales como la excavación. Cuando es usada como una etapa secundaria en el tratamiento *in situ*, se reducen los costos de transporte, minimizando el daño físico del suelo y los costos asociados con el tratamiento fuera del sitio (ITRC, 2009). El costo de la fitorremediación (en USD) se ha estimado en \$25-\$100 por tonelada de suelo y \$0.60-\$6.00 por cada 1000 galones de agua contaminada por compuestos orgánicos (May, 2011).

Otras ventajas son las siguientes:

- ✓ Se considera una tecnología verde y sostenible.
- ✓ Mejora la calidad del aire y secuestra los gases que provocan el efecto invernadero.
- ✓ Minimiza las emisiones de aire, flujo de agua y la generación de residuos secundarios.
- ✓ Controla la erosión, infiltración y emisiones de polvo.
- ✓ Percepción pública favorable, incluso como una oportunidad educativa.
- ✓ Mejora la estética, incluyendo la reducción de ruido.
- ✓ Aplicable a lugares remotos, potencialmente sin acceso.
- ✓ Se puede utilizar para complementar otras tecnologías de remediación (tren de tratamiento).
- ✓ Se puede utilizar para identificar y monitorear la contaminación.
- ✓ Puede ser instalado como una medida preventiva.
- ✓ Bajo mantenimiento, resistente y con auto reparación.
- ✓ Proporciona restauración y recuperación de suelos durante la limpieza.
- ✓ Puede tener un costo competitivo.

La creciente aceptación pública de tecnologías con plantas hace de la fitorremediación una aplicación biotecnológica prometedora. Sin embargo, la aplicación de la fitorremediación tiene limitaciones: los tiempos de proceso pueden ser muy prolongados y la biodisponibilidad de los contaminantes puede ser limitada. Para superar estas limitaciones

es importante comprender y descifrar los mecanismos que utilizan y desarrollan las plantas para la remoción y/o degradación de los contaminantes.

1.2.3 Mecanismos de fitorremediación

El paso crucial para que las plantas puedan metabolizar los contaminantes orgánicos es la absorción. Bajo ciertas condiciones climáticas, el carácter lipofílico del contaminante, expresado como su coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}), ha mostrado ser el parámetro determinante para la entrada a la raíz y la sucesiva translocación. Los contaminantes orgánicos con un $\log K_{ow} \leq 1$ se consideran muy solubles en agua y generalmente, en ambientes lluviosos o sistemas donde la tasa de evapotranspiración es alta, no son acumulados. Sin embargo, cuando no se presentan estas condiciones, los contaminantes pueden acumularse en la planta y generalmente son transportados hacia la parte aérea de las plantas vía xilema. Los contaminantes con un $\log K_{ow}$ entre 1 y 4, son absorbidos por las raíces y tienen movilidad vía xilema y aquellos con $\log K_{ow}$ mayor a 4 son altamente absorbidos por las raíces, con una lenta o nula translocación a los tallos y hojas. En la Tabla 3 se muestran los valores $\log K_{ow}$ de algunos contaminantes orgánicos frecuentemente estudiados (Yang y Zhu, 2007; Gomez-Eyles y col., 2010).

Tabla 3. Coeficiente de partición octanol/agua ($\log K_{ow}$) para contaminantes orgánicos

Compuesto	$\log K_{ow}$	Compuesto	$\log K_{ow}$
Anilina	0.9	Fluoreno	4.18
Fenil aceto nitrilo	1.6	Ácido dodecanoico	4.2
Ácido benzoico	1.9	Fenantreno	4.57
Nitrobenceno	1.9	Fluoranteno	4.7
Tolueno	2.7	Pireno	5.18
Naftaleno	3.6	DDT	6.2

Los contaminantes orgánicos son compuestos que pueden ser mineralizados completamente por diferentes plantas. Aunque el conocimiento de la degradación de contaminantes por el sistema metabólico de las plantas es aún limitado, comparado con el conocimiento del mismo proceso en bacterias, varios reportes confirman la importancia de la

fitorremediación como una tecnología emergente (Gerhardt y col., 2009). En la Figura 3 se ilustran los posibles mecanismos de fitorremediación de compuestos orgánicos: fitovolatilización, fitodegradación y fitoestimulación o rizodegradación (ITRC, 2009).

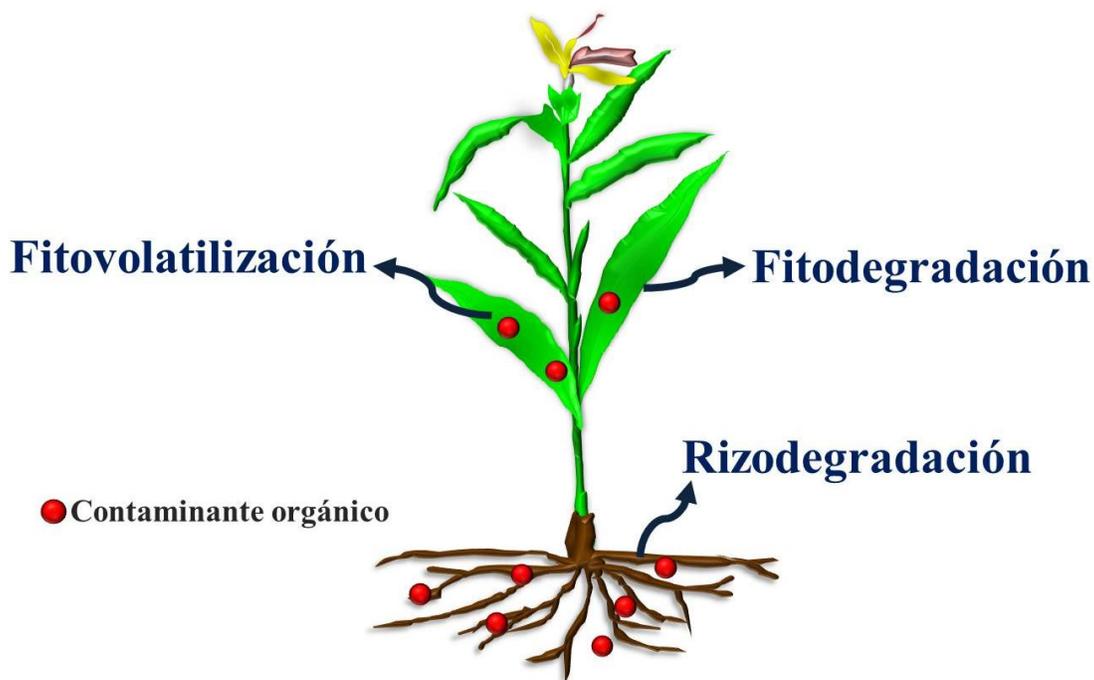


Figura 3. Representación esquemática de los posibles mecanismos de fitorremediación para contaminantes orgánicos.

Fitovolatilización. La capacidad natural de una planta para volatilizar un contaminante inicia a través de la absorción de los contaminantes por sus raíces: aquellos que son volátiles se difunden a través de la planta y finalmente son liberados a la atmósfera por los estomas abiertos en las hojas (transpiración), como se muestra en la Figura 4. Una vez liberados a la atmósfera, los compuestos con dobles enlaces pueden ser rápidamente oxidados por los radicales hidroxilo (ITRC, 2009).

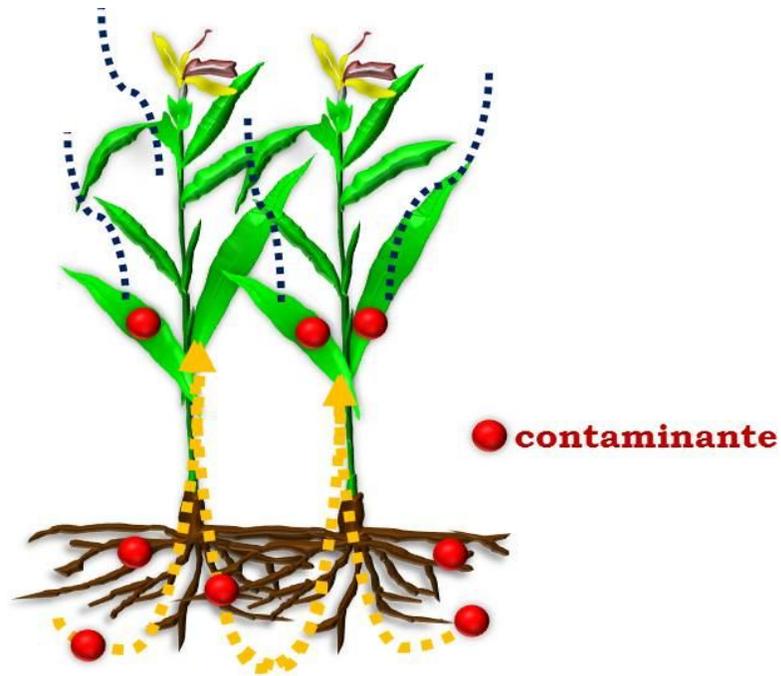


Figura 4. Representación esquemática del mecanismo de fitovolatilización.

Fitodegradación. En la Figura 5 se ilustra el mecanismo de fitodegradación, que también es llamado "fitotransformación". Este término se refiere a la transformación o mineralización a través de diversas reacciones enzimáticas internas y procesos metabólicos propios de la planta. Algunas especies de plantas degradan y/o transforman los contaminantes después de absorberlos. Esto lo hacen a través del proceso metabólico catalizado por enzimas, dentro de la raíz o en las células de la parte aérea. Entre las enzimas más conocidas en fitorremediación destacan las peroxidasas, las monoxigenasas, las nitrato reductasas y las fosfatasas. Otra forma de descomposición de los contaminantes pueda darse por la secreción de enzimas y compuestos químicos al suelo. Las enzimas secretadas son generalmente deshidrogenasas, oxigenasas y reductasas.

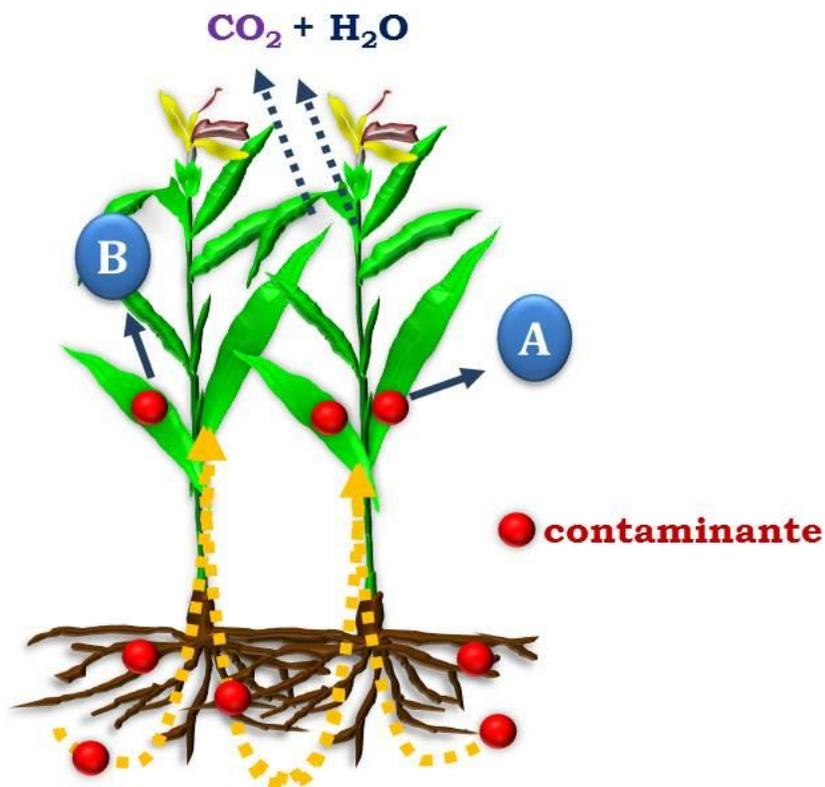


Figura 5. Representación esquemática del mecanismo de fitodegradación. A: actividades enzimáticas de la planta. B. oxidación fotosintética.

Fitoestimulación/Rizodegradación. Los contaminantes como los HAP son altamente hidrofóbicos y pueden ser absorbidos por la matriz del suelo. De esta manera, se disminuye su biodisponibilidad para ser incorporados por las plantas y continuar así con la sucesiva fitotransformación. El mecanismo que se ha observado para contrarrestar este efecto es la rizodegradación, como se muestra en la Figura 6, que se basa en la degradación microbiana de los contaminantes en la rizosfera. Esto ocurre porque la planta promueve el desarrollo de microorganismos degradadores de compuestos orgánicos (bacterias y hongos) a través de la producción de exudados radiculares. Un buen indicador de si una planta conserva un contaminante en la raíz es, como ya se mencionó anteriormente, el K_{ow} : altos valores de K_{ow} se corresponderían con una mayor probabilidad de que el compuesto quede retenido en las raíces, lo que propiciaría la degradación microbiana. Por consiguiente, en estos casos la rizodegradación podría ser el mecanismo más importante para la eliminación de compuestos orgánicos en suelos contaminados.

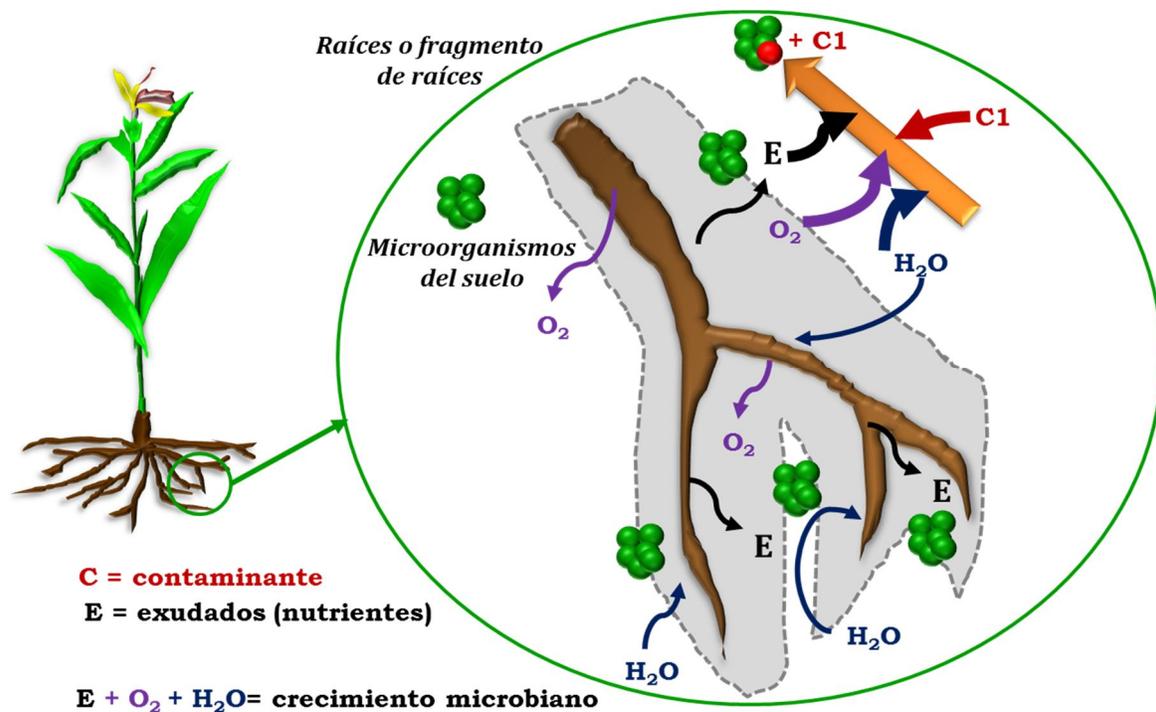


Figura 6. Representación esquemática del mecanismo de rizodegradación.

1.2.4 Planta fitorremediadora

Festuca arundinacea es una importante especie de gramínea forrajera perenne, ver Figura 7, conocida con el nombre común de festuca alta. Aunque es originaria de Europa y el norte de África, también crece en todas las regiones templadas del mundo (Rognli y col., 2010). Se introdujo en Estados Unidos en la década de 1800 y fue ampliamente cultivada hasta mediados del siglo XX. Es uno de los pastos más populares, por su abundante crecimiento, adaptabilidad a una gran variedad de suelos y climas, tolerancia al pastoreo y disponibilidad como forraje durante gran parte del año, en comparación con otras gramíneas forrajeras (Rognli y col., 2010). Además de ser utilizada como forraje y césped, sus usos se extienden para fines de fitorremediación por tener un sistema radicular extenso, profundo y fibroso. *F. arundinacea* ha sido ampliamente utilizada en la fitorremediación de compuestos orgánicos (Chen y col., 2003; Cheema y col., 2009; Sun y col. 2011) e inorgánicos (Begonia y col. 2005; Soleimani y col., 2010b). Además, festuca alta establece asociaciones simbióticas con hongos endófitos y recientemente se ha reportado el uso de esta asociación en la fitorremediación de suelos contaminados con petróleo (Soleimani y col., 2010a).



Figura 7. *Festuca arundinacea* (imagen tomada de experimentos en campo, UAM-I).

1.4 Hongos endófitos

Los hongos constituyen un conjunto de seres vivos que incluye desde organismos unicelulares a organismos pluricelulares macroscópicos. Están formados por células eucariotas con una pared rígida y se caracterizan por ser inmóviles; presentan nutrición heterótrofa por absorción y reproducción sexual y asexual (Deacon, 2006). Un grupo de hongos que viven dentro de los tejidos de las plantas, intracelular y extracelularmente, sin causar daño aparente, son los denominados endófitos (literalmente, la palabra endófito significa "dentro de la planta"). El rango de posibles hospederos y huéspedes es tan amplio como su definición literal, un ejemplo de huésped son los hongos filamentosos (Tanaka y col., 2012). De igual manera, el uso del término "endófito" se aplica para una variedad de estrategias simbióticas, que van desde saprofitos a parásitos, de patógenos a mutualistas. Los "endófitos" son comúnmente definidos como aquellos organismos cuyas infecciones son discretas, los tejidos infectados por el huésped son asintomáticos, al menos transitoriamente, y la colonización microbiana se puede demostrar que es interna (Schulz y Boyle, 2006).

1.4.1 Aislamiento

Hay buenas razones para el aislamiento de microorganismos endófitos, por ejemplo, para fines de fitorremediación y con el objetivo de usarlos como inoculantes para mejorar el crecimiento de las plantas. El procedimiento de aislamiento comúnmente usado comienza con la esterilización superficial de las raíces. Una vez esterilizadas, son maceradas y

colocadas en placas con agar nutritivo o se plantan pequeños fragmentos esterilizados superficialmente. Durante la esterilización superficial el agente esterilizante debería matar, teóricamente, todo microorganismo que se encuentre en la superficie, sin afectar el tejido del hospedero y el microorganismo endófito. Sin embargo, esto es difícil de lograr, debido a que se tiene que establecer un balance entre el tiempo adecuado de exposición del agente esterilizante para que no penetre en el tejido de la raíz y las condiciones necesarias para matar los microorganismos alojados en la superficie, sin que resulte mortal para algunos microorganismos endófitos. En general, la esterilización superficial de tejido de la raíz consta de los pasos siguientes: (i) lavar el tejido de la raíz bajo el chorro de agua, para eliminar las partículas de suelo adheridas a la superficie y la mayoría de microorganismos alojados en la superficie, (ii) tratamiento previo (opcional) para eliminar sustancias hidrofóbicas en la superficie de la planta y para proporcionar un mejor acceso para el agente esterilizante a la superficie de la raíz, (iii) esterilización de la superficie para eliminar los microorganismos restantes que colonizan la superficie de la raíz, (iv) realizar varios enjuagues en condiciones asépticas, utilizando una solución de lavado estéril y (v) comprobar la esterilización superficial de la raíz. Además, es importante garantizar la esterilización de las herramientas usadas durante este procedimiento, y que se optimicen los procedimientos para cada tejido de la planta, ya que la sensibilidad varía con las propiedades de las especies, edad y superficie (Hallmann y col, 2006).

1.4.2 Cultivo e identificación

Los hongos, como muchas bacterias, pueden cultivarse con facilidad en medios artificiales, tienen requerimientos nutritivos simples: una fuente de carbono orgánico, generalmente azúcar, y de nitrógeno suelen ser los elementos suficientes para obtener un buen crecimiento. Además toleran variaciones de pH y osmolaridad. Crecen fácilmente en los medios de cultivo convencionales, dando lugar a colonias macroscópicas visibles con morfología bien definida. Los hongos filamentosos pueden vivir sobre materia orgánica muerta (saprobios) o como parásitos de otros seres vivos, fundamentalmente vegetales, pero también de los animales y del hombre (Deacon, 2006).

La identificación de los hongos se basa en sus características morfológicas. En primer lugar por la morfología macroscópica de la colonia, color, textura y tasa de crecimiento. Para observar la morfología microscópica puede tomarse un pequeño fragmento de cultivo y montarlo entre un cubre y un porta objetos, en fresco o contrastando con un colorante para su posterior observación. Los hongos filamentosos se identifican a nivel de género y especie por la morfología del micelio; pero sobre todo, por las características microscópicas de las esporas asexuadas y los elementos que las originan (Huang y col., 2009). Para conseguir la producción de esporas, a veces se requieren medios de cultivo especiales que facilitan la esporulación. Los hongos que no esporulan son difícilmente identificables, aunque varias condiciones de crecimiento y diferentes medios de cultivo se han optimizado para promover la esporulación de los mismos. Sin embargo, una gran cantidad de hongos no esporulan y este micelio “estéril” frecuentemente es considerado en estudios de endófitos. En este caso, se recurre a la identificación usando técnicas de Biología Molecular. Las técnicas utilizadas en la identificación de especies y géneros de hongos, incluyen la extracción directa del DNA y la amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica analiza normalmente secuencias de DNA ribosomal, especialmente las regiones conservadas ITS (*internal transcribed spacers*) (Anderson y Cairney, 2004; Huang y col., 2009).

1.4.3 Reproducción y colonización

Las formas asexual o anamorfo (ver Apéndice I) de los endófitos de gramíneas son transmitidas verticalmente por el crecimiento de las hifas dentro de las semillas, mientras que el estado sexual, como *Epicholë* puede ser además de ser transmitido verticalmente (Kuldau y Bacon, 2008) por clonación (creciendo dentro de las semillas) o sexual y horizontalmente (vía esporas). Una vez dentro de la planta, los hongos endófitos residen en tejidos específicos de la planta, como el xilema o los espacios tanto inter como intracelulares de la raíz (como se observa en la Figura 8) o colonizar la planta sistemáticamente por transporte a través del sistema vascular o del apoplasto (Bacon y Yates, 2006).

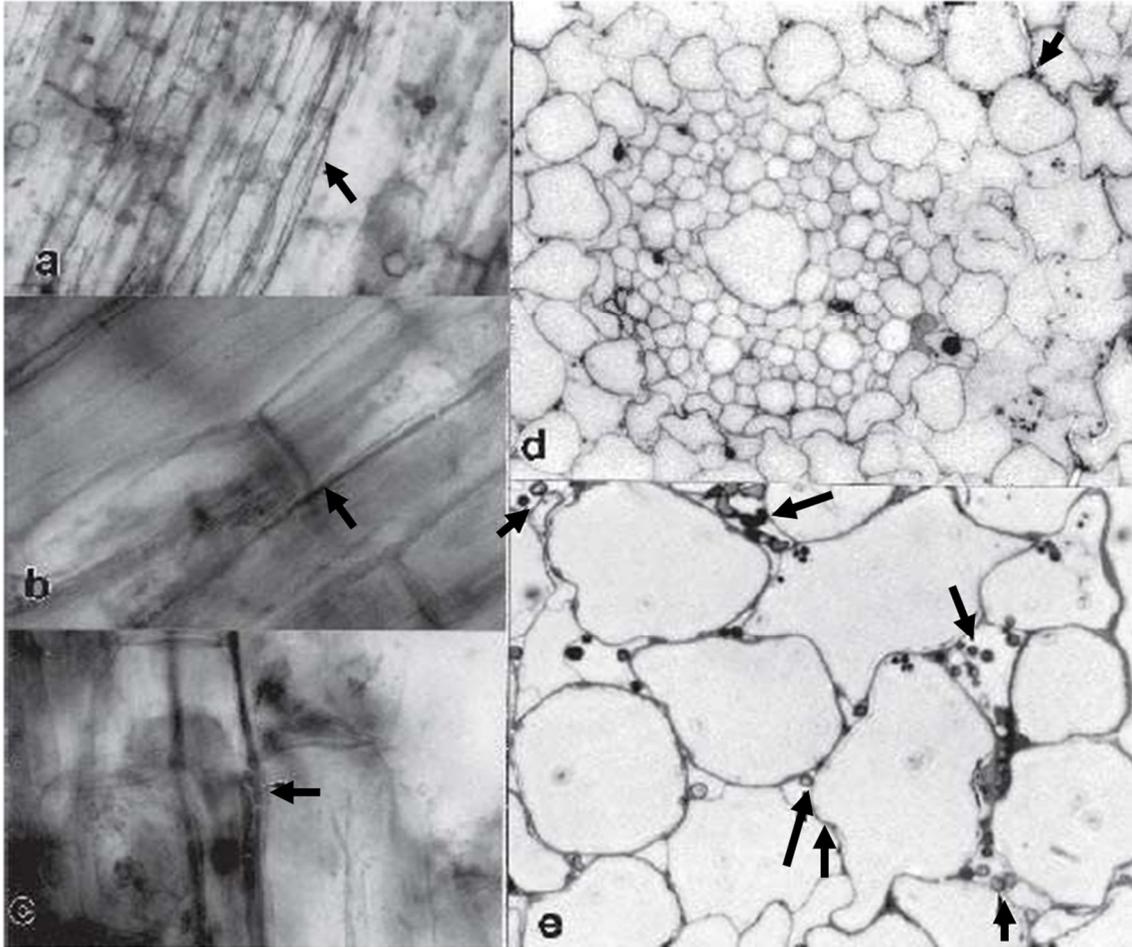


Figura 8. Micrografías ópticas del habitat del hongo endófito *Fusarium verticillioides* en raíces de plántulas de maíz (2 semanas de edad). **a.** Hongo (cabeza de flecha) que van colonizando en paralelo dentro de los espacios intercelulares de la raíz primaria (54.4X). **b.** Hongo (cabeza de flecha) entre dos paredes celulares de la raíz del maíz (272X, contraste de fase). **c.** Hongo creciendo en paralelo en los espacios intercelulares (272X, contraste de fase). **d.** Sección transversal de una raíz secundaria con hongo (cabeza de flecha) en los espacios intercelulares (54.5X) (cuerpos esféricos muy oscuros dentro de las células son artefactos de tinción). **e.** Sección transversal de la corteza de la raíz primaria con grupos de hifas (cabezas de flecha) en los espacios intercelulares (109X, contraste de fase). Fuente: Bacon y Yates, 2006.

1.5 Interacción planta-microorganismo para fines de fitorremediación

El uso de plantas sin la contribución de los microorganismos para fitorremediación tiene una desventaja significativa, ya que al ser foto-autótrofas no utilizan moléculas orgánicas

como fuente de energía o de carbono. El metabolismo de moléculas orgánicas (que no sean fotosintéticas) en la planta consiste en transformaciones generales a formas más solubles en agua y el subsecuente secuestro, por ejemplo en las vacuolas. Por el contrario, el metabolismo microbiano a menudo mineraliza compuestos orgánicos, es decir, convirtiéndolos en CO₂, agua y biomasa celular. Por lo tanto, con el fin de conseguir una degradación más completa y eficiente de los compuestos orgánicos, las plantas dependen de su asociación con los microorganismos (Weyens y col., 2009). Sin la contribución de los microorganismos, la fitorremediación por sí sola puede, por lo tanto, no ser una tecnología viable para muchos contaminantes orgánicos de características hidrofóbicas. La interacción planta-microorganismo en la rizosfera a menudo es exitosa para remediar ambientes contaminados con compuestos orgánicos recalcitrantes de ese tipo. Los microorganismos juegan un papel importante en mecanismos como la fitoestimulación (por ejemplo, produciendo auxinas, implicadas en la elongación de la raíz) y la rizoremediación (degradando contaminantes). Sin embargo, ninguna de las numerosas interacciones planta-microorganismo está completamente estudiada (Lazcano y col., 2010).

1.6 Interacción planta-hongo endófito.

La planta provee al hongo endófito alimento, hospedaje y protección; por su parte, aunque no hay certeza sobre los mecanismos de acción, los endófitos confieren gran potencial adaptativo a las especies vegetales hospederas frente a condiciones adversas que generen estrés, ya sean de tipo abiótico (salinidad, acidez) o biótico (ataque de plagas). Las plantas, mediante la producción de exudados y residuos celulares provenientes de las raíces, favorecen el crecimiento de endófitos degradadores de contaminantes orgánicos, dando como resultado, un incremento en la degradación a causa de la alta densidad y actividad metabólica que se genera. En la Tabla 4 se muestran las características principales de los hongos endófitos que interaccionan con raíces de plantas. Usualmente el crecimiento del hongo endófito puede ser inter y/o intracelular. En la interacción raíz-hongo endófito, el endófito provee de resistencia inducida (síntesis de fitohormonas, mejoramiento en el acceso a nutrientes y minerales), favoreciendo el crecimiento y la síntesis de metabolitos antagónicos contra depredadores y antagonistas.

Tabla 4. Características de la interacción de los hongos endófitos con las raíces de las plantas.

Característica	Hongos endófito
Modo y sitio de infección.	A través de los estomas, pared celular o heridas.
Fuente nutricional durante la primera fase de infección.	Material de reserva en las esporas, células muertas de la corteza, restos vegetales, exudados del hospedero.
Fuente nutricional (colonización).	Componentes del apoplasto y simplasto.
Crecimiento en raíces.	Inter- y/o intracelular.
Colonización de tejidos.	Usualmente fuera del tejido vascular.
Estado fisiológico.	Antagonismo balanceado.
Tipo de interacción.	Comensalismo, mutualismo o patógeno latente.
Beneficios para el microorganismo simbiote.	Suministro de nutrientes y protección contra estrés ambiental, ventajas para la reproducción y colonización a hospederos senescentes.
Beneficios para la planta simbiote.	Resistencia inducida, mejora el crecimiento (fitohormonas, mejora el acceso a nutrientes y minerales), síntesis de metabolitos antagonicos contra depredadores y antagonistas.

(Fuente: Schulz y Boyle, 2006)

Muchas plantas, como por ejemplo el género festuca, en su estado natural son colonizadas por endófitos que pueden formar asociaciones benéficas con su hospedero. Los principales beneficios que algunos endófitos brindan a sus hospederos son: (i) mejorar el crecimiento a través de la producción de fitohormonas, (ii) favorecer la absorción de nutrientes y (iii) resistencia a estrés ambiental (Khan y Doty, 2011). Para fines de fitorremediación, la mayoría de los contaminantes orgánicos de alto peso molecular pueden ser fitotóxicos dificultando su degradación. Esto se debe a que las plantas son autótrofas. Este problema podría resolverse mediante el uso de plantas que, en su estado natural, establecen interacciones con microorganismos endófitos. En la Tabla 5 se muestran ejemplos de endófitos de plantas que pueden degradar contaminantes orgánicos.

Tabla 5. Ejemplos de interacciones planta-endofito que pueden degradar contaminantes orgánicos

Planta hospedera	Tejidos de la planta	Endófito	Contaminantes orgánicos degradados	Referencias
<i>Lolium multiflorum</i> <i>Lotus corniculatus</i>	Raíces y parte aérea	<i>Sphingopyxis</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	Alcanos	Yousaf y col., 2010
<i>Lolium multiflorum</i>	Raíces	<i>Pseudomonas</i> sp.	Alcanos	Andria y col., 2009
<i>Allium macrostemon</i>	Tallos	<i>Enterobacter</i> sp.	Pireno	Sheng y col., 2008
<i>Zea mays</i>	NM	<i>Burkholderia cepacia</i>	Fenol y tolueno	Wang y col., 2010

NM: no mencionado

2. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios en cultivos *in vitro* han demostrado que los mecanismos predominantes de fitorremediación que emplean dos tipos de gramíneas (*Bouteloua curtipendula* y *Festuca arundinacea*) en la degradación de hidrocarburos son la fitoextracción y la fitodegradación (Reynoso-Cuevas y col., 2011), pero las condiciones que podrían enfrentar las plantas en el campo son diversas e incluyen la participación directa o indirecta de los microorganismos nativos del suelo (hongos o bacterias). En el trabajo de Maestría realizado por Cruz-Hernández (2008) se demostró que la remoción de pireno (hidrocarburo aromático policíclico con efectos carcinogénicos) fue más eficiente cuando *F. arundinacea* crecía en presencia de un hongo filamentoso en comparación con el hongo o la planta creciendo solos, en los mismos medios de cultivo y bajo condiciones asépticas. Sin embargo, no se encontró una explicación clara que permitiera diferenciar el papel que desempeña esta planta cuando se encuentra interactuando con microorganismos y de qué manera inciden en los mecanismos de fitorremediación. Aunque la fitorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos asistida por microorganismos, usando bacterias endófitas, ha sido sujeto de varios estudios (Barac y col., 2004; Khan, 2007; Phillips y col., 2008, Rashid y col., 2012) se conoce poco acerca del efecto de los hongos endófitos en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo.

En este proyecto se utilizó un hongo filamentoso aislado de las semillas comerciales de *F. arundinacea*. La presencia de este tipo de hongos en las semillas de gramíneas no es algo nuevo; Tarkka y col. (2008) reportan que la familia Poaceae (familia a la que pertenece *F. arundinacea*) muestra evidencia de establecer asociaciones con hongos endófitos, citando por ejemplo el género *Epichloë* (forma asexual = *Neotyphodium* spp.). Por ello, este trabajo se centra en el estudio de los mecanismos de fitorremediación estimulados por la interacción planta-hongo endófito en la degradación de hidrocarburos.

3. HIPÓTESIS

En la degradación de hidrocarburos, la interacción planta–hongo filamentoso estimula los mecanismos de fitodegradación y rizodegradación.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar los mecanismos de fitorremediación estimulados en la degradación de hidrocarburos por la interacción planta – hongo filamentoso, en diferentes matrices (agrolita y suelo).

4.2 Específicos

- Determinar el carácter endófito del hongo filamentoso
- Evaluar la fitopatogenicidad del hongo filamentoso y su efecto en el crecimiento de *F. arundinacea*, bajo condiciones asépticas.
- Identificar el hongo filamentoso.
- Evaluar la capacidad del hongo filamentoso para mineralizar hidrocarburos bajo condiciones asépticas.
- Evaluar la eficiencia en el consumo de hidrocarburos por el sistema planta - hongo filamentoso en suelo modelo y suelo y localizar el destino final de los removidos.
- Evaluar la supervivencia de la interacción planta-hongo filamentoso sobre un suelo previamente remediado y la remoción de hidrocarburos totales del petróleo bajo condiciones de campo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Planta

Las semillas de *Festuca arundinacea* se adquirieron en la Central de Abastos de la Cd. de México. Se seleccionaron manualmente las semillas no dañadas y se almacenaron en bolsas de papel en oscuridad a temperatura ambiente para su posterior uso.

5.2 Hongo

Se utilizó la cepa de un hongo filamentoso, aislada de las semillas desinfestadas de *F. arundinacea* y conservada en el laboratorio W-108 de la Universidad Autónoma Metropolitana como inóculo para los estudios de los mecanismos de degradación de hidrocarburos.

5.3 Suelo

En este trabajo se utilizaron tres tipos de suelo (i) libre de contaminantes, (ii) modelo y (iii) contaminado, los cuales se describen a continuación:

5.3.1 Suelo libre de contaminantes

Se utilizó suelo libre de contaminantes, colectado de 0-20 cm de profundidad de un sitio ubicado en Hueyapoxtla, Estado de México (19°54'10.6"N, 99°05'16.0"W). La muestra de suelo se transportó al laboratorio e inmediatamente se secó al aire y se pasó a través de un tamiz de 2 mm para eliminar manualmente piedras y raíces. La muestra de suelo fue identificada como un suelo arenoso-arcilloso-limoso, por la distribución de tamaño de partícula inicial (54.8% arena, 25.2% limo y 24.6% arcilla). El contenido de materia orgánica fue 4.2% y el pH fue de 7.53.

5.3.2 Suelo modelo

Se utilizó como suelo modelo agrolita, que es un compuesto natural de silicatos, tamizado con un tamaño de partícula 1.19-4.76 mm, lavado tres veces consecutivas con agua caliente (50-60°C) y finalmente secado en charolas a temperatura ambiente. Una vez seca la agrolita, se almacenó en bolsas de plástico.

5.3.3 Suelo con hidrocarburos totales del petróleo

Se utilizó una muestra de suelo (4 ton), cortesía de PEMEX-Refinación, proveniente de la Ex. Refinería 18 de marzo, previamente remediado (*i.e.* llevado hasta los límites máximos permisibles por la Norma Oficial Mexicana NOM-138-Semarnat/SS-2003). Las cuatro toneladas de suelo fueron llevadas a los espacios verdes de la Universidad Autónoma Metropolitana y colocadas en una parcela de 3 x 3 m sobre una geomembrana, con la finalidad de evitar lixiviados. La concentración de hidrocarburos totales contenidos en la muestra de suelo se presenta en la Tabla 6.

Tabla 6. Concentración de hidrocarburos totales del petróleo presente en el suelo de la Ex. Refinería 18 de marzo previamente remediado.

Hidrocarburos	*Concentración (mg kg de suelo ⁻¹)
Fracción pesada (>C18)	1183.29 ± 183.30
Fracción media (C10 – C18)	416.31 ± 81.29
Fracción ligera (C5 – C10)	**41.31

*Datos analizados por Intertek Testing Service de México S. A. de C. V. Media ± DS, n=4.

**Detectado en una sola muestra. Los reportes de estos análisis se encuentran en el Apéndice III.

5.4 Hidrocarburos

Los hidrocarburos en estudio fueron: Hexadecano (HXD), Fenantreno (PHE) con una pureza mayor al 96% y pireno (PYR) con una pureza mayor al 98% (Sigma - Aldrich). Las sustancias fueron disueltas en diclorometano (DCM) (Mallinckrodt Chemical). La mezcla de hidrocarburos (MHC) contenía HXD, PHE y PYR (1:0.5:0.5 p/p/p).

5.5 Cultivo de la planta

5.5.1 Esterilización superficial de las semillas

Las semillas almacenadas en las bolsas fueron introducidas en un sobre de papel filtro, se sumergieron en una solución con detergente comercial marca Roma a una concentración de

0.02 g mL⁻¹, durante 20 min con agitación constante; a continuación se lavaron con agua destilada. En una campana de flujo laminar, el sobre con las semillas se sumergió en etanol al 70% (v/v) durante 30 s, seguido de una solución de hipoclorito de sodio 10% (v/v) adicionado con 0.1 ml de Tween-20 durante 25 min, con agitación constante. Nuevamente el sobre con las semillas se sumergió en etanol al 70% (v/v) durante 1 min, para posteriormente lavarse con 150 ml de agua desionizada estéril. El sobre con semillas esterilizadas superficialmente (desinfestadas) se abrió en condiciones estériles cuando fue necesario su posterior cultivo.

5.5.2 Medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS). En un matraz de 1 L se adicionaron 4.4 g L⁻¹ del medio (Sigma – Aldrich) y 30 g L⁻¹ de sacarosa. El pH se ajustó a 5.8 con KOH 0.1 N, se agregó 2 g L⁻¹ de fitagel y se llevó a ebullición (Murashige y Skoog, 1962).

5.5.3 Tubos de cultivo

Se adicionaron 10 mL de medio MS con 10 g L⁻¹ de sacarosa (apartado 5.5.2) a cada tubo de cultivo, con un diámetro de 2.5 cm y altura de 15 cm; una vez adicionado el medio, los tubos fueron cerrados y esterilizados a 15 lbin² durante 15 min. Los tubos de cultivo con menor concentración de sacarosa se utilizaron para los estudios relacionados con la planta e interacción planta - hongo filamentoso.

5.5.4 Germinación y crecimiento de *F. arundinacea*

La germinación y crecimiento de *F. arundinacea* se realizó en tubos de cultivo (condiciones descritas en el apartado 5.5.3). En cada tubo se colocó una semilla previamente desinfestada. Una vez sembradas las semillas en los tubos, en condiciones asépticas, se conservaron cerrados con tapas de plástico sellados con Parafilm a 25°C, con fotoperiodos de 16 h durante 30 días.

5.6 Cultivo del hongo filamentoso

5.6.1 Método de aislamiento del hongo filamentoso

En esta técnica se tomaron semillas de *F. arundinacea* previamente desinfestadas (ver apartado 5.5.1), se sembraron en los tubos de cultivo (ver apartado 5.5.3) y se incubaron a 25°C con fotoperiodos de 16 h, durante 20 días. Las semillas germinaron después del séptimo día. Una vez germinadas, se seleccionaron aquellas semillas donde también se observó crecimiento de micelio. Posteriormente, en campana de flujo laminar y utilizando un asa estéril para hongos, se inoculó el micelio en cajas de Petri que contenían el mismo medio (MS) empleado para la germinación y cultivo de las plantas. Las cajas con el micelio se incubaron a 30°C durante 10 días.

5.6.2 Método de conservación

La conservación de la cepa se realizó inoculando discos de micelio (5 mm) sobre cajas de Petri con 25 mL de medio agar papa dextrosa (PDA) y medio MS (apartado 5.5.2), previamente esterilizados a 15 lb in⁻² durante 15 min. Una vez inoculadas las cajas de Petri, fueron colocadas en forma invertida dentro de una incubadora a 30°C, durante 10-14 días (Aquiahuatl y Pérez, 2004).

5.6.3 Preparación de la suspensión de micelio

Un matraz Erlenmeyer de 100 mL que contenía 50 mL de medio MS sin fitagel (apartado 5.5.2) fue inoculado con un disco de la cepa (5 mm resultado de la incubación en cajas de Petri con medio MS durante 14 días, a 30°C) cajas de Petri fue incubado a 30°C y 200 r.p.m. durante diez días. Los aglomerados microbianos (pellets) formados se colocaron en un tubo de vidrio que contenía 5 mL de una solución de NaCl 0.9% p/v y ocho perlas de vidrio. Con ayuda de un vórtex se agitaron hasta formar la suspensión homogénea de micelio. La suspensión de micelio fue usada como inóculo para los experimentos de remoción de hidrocarburos.

5.7 Experimentos sin hidrocarburos

5.7.1 Prueba de endofiticidad

Las semillas fueron sembradas en tubos de cultivo (condiciones descritas en el apartado 5.5.4). A los 20 días de cultivo, las plántulas fueron inoculadas con un disco de micelio (5 mm). Después de 45 días de interacción, se cosecharon las plantas, separándose en parte aéreas y raíces. Para la valoración del carácter endófito solamente se emplearon las raíces. Estas fueron esterilizadas superficialmente: en campana de flujo laminar fueron sumergidas en etanol al 70% v/v durante 30 s, posteriormente se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio 10% v/v durante 10 min, seguido de un tratamiento con etanol al 70% v/v durante 30 s y finalmente fueron lavadas con agua esterilizada. Las raíces esterilizadas superficialmente se segmentaron (5 mm de longitud) con un bisturí estéril y fueron cultivadas en cajas de Petri con PDA (30°C, 10 días). La colonización de las hifas fue monitoreada con ayuda de un microscopio confocal (Zoom Stereo Microscope, Olympus SZ61).

5.7.2 Prueba de fitopatogenicidad y cortes transversales de raíces

Para la prueba de fitopatogenicidad, la germinación y crecimiento de *F. arundinacea* e inoculación con el hongo filamentoso se realizó de la misma manera que para la prueba de endofiticidad (apartado 5.7.1), salvo en lo relacionado con el tiempo de interacción planta – hongo filamentoso: después de 60 días de interacción, las respuestas fitopatógenas fueron evaluadas como positiva o negativa. Se consideró positiva si la planta presentaba colonización del hongo en la parte aérea o síntomas de senescencia (ver Apéndice I). Además, las raíces de *F. arundinacea* inoculadas y no inoculadas con el hongo filamentoso fueron cosechadas, lavadas con agua destilada y fijadas con p-formaldehído durante 3 h. Una vez fijadas, se realizaron cortes transversales a las raíces (1 mm de longitud) y fueron observadas en un microscopio óptico (Biological Microscope, Olympus CX31).

5.8 Experimentos con hidrocarburos

5.8.1 Contaminación del suelo modelo y suelo

La contaminación de la agrolita (suelo modelo) se realizó agregando la solución de MHC disuelta en DCM a frascos de vidrio de 500 mL que contenían 40 g de suelo modelo, se cubrieron con aluminio y se mezclaron manualmente. El solvente se dejó evaporar en una campana de extracción, para posteriormente trasplantar las plántulas al suelo modelo contaminado. La contaminación del suelo se realizó adicionando lentamente una solución de la mezcla de hidrocarburos (MHC) disueltos en acetona. Se almacenó en bolsas de plástico oscuras durante cuatro semanas a temperatura ambiente, mezclando manualmente dos veces por semana, y se fue evaporando gradualmente la acetona en una campana de extracción. La cantidad de solución de MHC adicionada al suelo modelo y al suelo fue la necesaria para obtener la concentración de 1 500 mg kg⁻¹. Después de 40 días de almacenado el suelo, se cuantificó la concentración de hidrocarburos disponibles, concentración que se consideró como la inicial del experimento.

5.8.2 Hongo filamentoso

Condiciones asépticas. Para evaluar la capacidad del hongo filamentoso para mineralizar la mezcla de hidrocarburos, se utilizaron botellas serológicas de 150 mL. A cada botella se le adicionaron 5 g de agrolita contaminada con 1 500 mg de MHC (kg de agrolita)⁻¹ y se esterilizaron a 15 lb in⁻² durante 15 min. En una campana de flujo laminar, 20 mg de biomasa BS y 10 mL de medio MS sin sacarosa (apartado 5.5.2) fueron adicionados a cada unidad experimental. Las botellas serológicas fueron cerradas con tapones de plástico y selladas con aros de aluminio, manteniéndose a 30°C durante 17 días.

5.8.3 Interacción planta – hongo filamentoso

Condiciones de invernadero. Para evaluar la capacidad de remoción y acumulación de hidrocarburos por la interacción planta-hongo filamentoso, después de 30 días de crecimiento en tubos de cultivo las plantas de *F. arundinacea* fueron trasplantadas a las unidades experimentales (frascos de vidrio oscuros cilíndricos) con suelo modelo (40 g) o suelo (400 g). Se colocaron 6 y 3 plantas en las unidades experimentales que contenían suelo modelo y suelo, respectivamente. Las unidades experimentales con las plantas se

mantuvieron en una cámara de crecimiento a 22-28°C con fotoperiodos de 16 h. A los 20 días de trasplantadas, se inoculó 1 mL de la suspensión de micelio por unidad experimental, en la zona de la rizosfera (ver descripción en el apartado en 5.2.3), manteniéndose en las mismas condiciones durante otros 45 días.

Condiciones de campo. Para evaluar la supervivencia de la planta y la remoción de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) por la interacción planta-hongo filamentoso, seis plantas de *F. arundinacea* fueron trasplantadas a cada unidad experimental que contenían 400 g de suelo libre de contaminantes, manteniéndose en la cámara de crecimiento a 22-28°C con fotoperiodos de 16 h. A los 30 días de trasplantadas se inoculó con 1 mL de la suspensión de micelio (ver descripción en el apartado en 5.2.3) y se mantuvo en las mismas condiciones. Después de 60 días, las plantas inoculadas con el hongo filamentoso y sin inocular fueron trasplantadas directamente a la parcela que contenía 4 toneladas de suelo contaminado proveniente de la Ex. Refinería 18 de Marzo, previamente remediado. La parcela, ubicada en la UAM-I, fue dividida en dos partes por una barrera de madera: una de las secciones contenía las plantas inoculadas con el hongo y la otra, las que carecían del mismo. Cada 25 cm se colocó una planta de *F. arundinacea*, como se ilustra en la Figura 9, para completar un total de 50 plantas con hongo y 50 sin hongo.

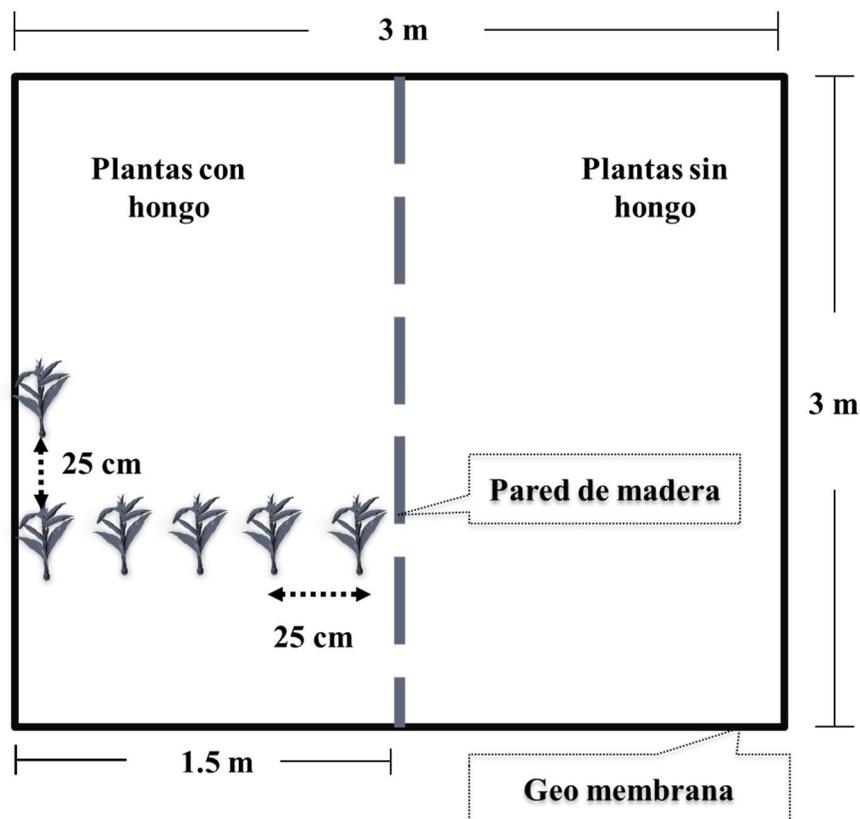


Figura 9. Estrategia experimental para trasplantar *F. arundinacea* con y sin hongo en suelo contaminado de la Ex. Refinería 18 de marzo.

5.9 Métodos analíticos

5.9.1 Identificación del hongo filamentoso

Crecimiento del hongo en medio líquido. Un matraz de 100 mL que contenía 50 mL de medio (en g L^{-1}): sacarosa, 40; NaNO_3 , 3, extracto de levadura, 2; KCl, 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, se inoculó con un disco (5 mm) de micelio y se incubó a 30°C y 200 r.p.m. durante 48 h. El micelio resultante se separó, en condiciones estériles, a través de un filtro de nylon Nyltal estéril de $30\ \mu\text{m}$ de diámetro de poro. El micelio retenido fue lavado con 100 mL de NaCl 0.9% (p/v) estéril, se eliminó el exceso de esta solución con papel de filtro estéril, se colocó en un mortero y se maceró con nitrógeno líquido. El polvo se colocó en tubos Eppendorf y se congeló (-70°C) durante 12 h, posteriormente fue liofilizado utilizando una liofilizadora digital. La muestra liofilizada se conservó a -20°C para su posterior uso.

Extracción del DNA. Se utilizó el Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega). Se colocaron 40 mg de micelio liofilizado en un tubo Eppendorf, se le adicionaron 600 μ L de solución de lisis y se mezcló durante 3 s en un vórtex, la mezcla en el tubo de microcentrífuga se incubó a 65°C durante 20 min. Una vez transcurrido este tiempo se adicionaron 3 μ L de una solución para precipitar proteínas, se mezcló durante 20 s y se centrifugó a 14 000 \times g. El sobrenadante se recuperó y se le adicionaron 600 μ L de isopropanol, almacenándose a -20°C.

Electroforesis. Para comprobar que se extrajo el DNA, la muestra se corrió en un gel de agarosa al 0.7% p/v. En 50 mL de TAE (mezcla de base Tris, ácido acético y EDTA) (1% p/v) se agregaron 35 mg de agarosa, llevándose a ebullición para disolver la agarosa. La solución de agarosa se agregó al soporte del aparato de electroforesis. Una vez que se formó el gel se cargaron 20 μ L del marcador de tamaño y la muestra en los pozos del gel de agarosa, aplicándose una diferencia de potencial de 84 volts durante 90 min. El gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio durante 30 min.

Amplificación. La amplificación de ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Se utilizaron dos cebadores basados en los espaciadores internos transcritos (*internal transcribed spacers*): ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4b (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), cebadores de la región conservada del 18S rDNA y del 28S rDNA de hongos (Gardes y Bruns 1993; Larena y col., 1999). En la Tabla 7 se muestra la mezcla de reacción para la amplificación, la reacción se llevó a cabo durante 30 ciclos de 94°C durante 45 s, 55°C durante 1 min y 72°C durante 45 s.

Tabla 7. Componentes utilizados para la amplificación de los ácidos nucleicos.

COMPONENTES	Concentración final de la mezcla ($\mu\text{L muestra}^{-1}$)
Buffer	5
MgCl ₂	5
dNTP	1
Cebador I (ITS 5)	1.5
Cebador II (ITS 4b)	1.5
DNA molde	1
H ₂ O inyectable	34.5
Taq DNA polimerasa	0.5

Purificación del fragmento amplificado. El producto amplificado incluyó una secuencia parcial de los genes 18S rDNA, el ITS1, el complemento del gen 5.8S rDNA, el ITS2 y una secuencia parcial del gen de 28 s rDNA. El producto amplificado fue separado en un gel de agarosa al 1.5% (p/v). La purificación de la muestra de PCR se realizó utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). A 1 μL de la muestra de PCR se le adicionaron 5 μL de buffer PB y se centrifugó a $14000 \times g$ durante 60 s usando tubos Qiaquick spin column de 2 mL. Se descartó el filtrado quitando la canastilla, se colocó nuevamente en el tubo y se agregaron 0.75 mL de buffer PE, se centrifugó a $14000 \times g$ durante 60 s, se volvió a descartar el filtrado y ahora la canastilla se colocó en un tubo Eppendorf estéril, al que se le adicionaron 30 μL de buffer EB en el centro de la membrana; se dejó reposar 1 min y se centrifugó a $14000 \times g$ durante 60 s; la canastilla se desechó y el tubo Eppendorf con el filtrado se conservó a -7°C . La secuencia de nucleótidos del producto (ver anexo 1) se determinó utilizando AmpliTaq DNA Polymerase FS y el ABIPrism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit en un ABIPRISM 3100 (Applied Biosystems). La secuencia de nucleótidos del producto amplificado se analizó utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

5.9.2 Evaluación del crecimiento de la planta

Después de 65 días de crecimiento en suelo modelo o suelo, se aplicó el criterio de tomar la hoja más grande de cada una de las plantas para determinar el crecimiento de la parte aérea

(Cruz-Hernández, 2008), midiendo con un vernier la parte aérea. La parte aérea y raíces se secaron en una estufa a 60°C durante 8 días, se convirtieron en polvo con la ayuda de un mortero y nitrógeno líquido y se pesaron para obtener el dato de peso seco de biomasa y para su uso posterior como plantas deshidratadas.

5.9.3 Extracción de hidrocarburos en la planta

Una vez deshidratadas la parte aérea y las raíces, se usaron para extraer los hidrocarburos. Las muestras fueron colocadas por separado en embudos de separación y se realizaron tres extracciones con 10 mL de DCM cada una (ver Figura 10), utilizando una campana de extracción. Previo a la extracción, la parte aérea se saponificó (15 mL de KOH disuelto en MeOH/H₂O (80:20; v/v), durante 30 min a 60°C), con la finalidad de eliminar compuestos que interfirieran con la cuantificación de los hidrocarburos en estudio. Se recuperó la fase orgánica en matraces bola para concentrar los hidrocarburos extraídos utilizando un Rotavapor. Posteriormente, los hidrocarburos fueron cuantificados por cromatografía de gases.



Figura 10. Extracción de hidrocarburos de la parte aérea y las raíces de *F. arundinacea* utilizando embudos de separación.

5.9.4 Extracción de hidrocarburos residuales en suelo modelo y suelo.

Se pesaron 5 g de suelo o suelo modelo secados en una estufa a 60°C durante 72 h. Los hidrocarburos residuales en suelo fueron extraídos realizando una extracción con solvente asistida por microondas (CEM, Mars Xpress). Para el suelo modelo se realizaron tres extracciones. La extracción se realizó con 30 mL de la mezcla acetona: diclorometano (1:1

v/v). La temperatura de extracción fue de 150°C a una presión de 175 psi y la duración del experimento fue de 30 min. Se recuperó la mezcla acetona: diclorometano en matraces bola y las muestras se concentraron utilizando un Rotavapor, para su posterior cuantificación.

5.9.5 Método de cuantificación de hidrocarburos

La cuantificación de los hidrocarburos extraídos de la parte aérea, de las raíces, del suelo contaminado artificialmente y del suelo modelo se realizó en un cromatógrafo de gases VARIAN 3900 con autoinyector (CP-8410). Se utilizó una columna capilar AT-1HT (15 m × 0.25 mm × 0.1 µm) y helio como gas acarreador, con un flujo de 2 mL min⁻¹. Alícuotas de 2 µL de las muestras fueron inyectadas en modo split. La temperatura del inyector y del detector fue de 300°C, la temperatura del horno inicial fue 100°C (2 min) y se aumentó 20°C por minuto hasta los 200°C (1 min). El tiempo de análisis fue de 8 min.

5.9.6 Cuantificación del CO₂ producido por el hongo filamentoso.

El CO₂ producido por el hongo filamentoso (experimento descrito en el apartado 5.8.2) fue cuantificado por cromatografía de gases, utilizando un detector de conductividad térmica. Las temperaturas del inyector, columna y detector fueron 50°C, 40°C y 117°C, respectivamente. El volumen de inyección fue de 0.25 ml y se utilizó una columna CTR1 (All Tech).

5.9.7 Cuantificación de la supervivencia de *F. arundinacea*

Aquellas plantas que se observaron verdes y saludables después de haber sido trasplantadas al suelo contaminado de la Ex Refinería 18 de marzo se consideraron en la variable supervivencia.

5.9.8 Análisis de los datos

Para el análisis estadístico se utilizó el programa NCSS-2000, versión 2001. El análisis de varianza (ANOVA) se realizó mediante pruebas de comparación de Tukey ($\alpha \leq 0.05$, n=3).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Hongo

6.1.1 Aislamiento y prueba de endofiticidad

Sin la contribución de los microorganismos la fitorremediación por sí sola puede no ser una tecnología viable para el tratamiento de muchos contaminantes orgánicos hidrofóbicos. Por lo tanto, hay buenas razones para aislar y usar microorganismos asociados a las plantas capaces de remover contaminantes orgánicos, por ejemplo, hongos filamentosos transmitidos vía semillas (seedborne) de gramíneas (Kuldau y Bacon, 2008). En estudios previos (Cruz-Hernández, 2008), durante la germinación, bajo condiciones asépticas, de semillas esterilizadas superficialmente de *F. arundinacea* también se observó un crecimiento constante de micelio (junto con la plúmula y/o raíz), en aproximadamente el 8 por ciento del total de semillas germinadas. De ahí surgió el interés por aislar dicho hongo. Un tipo de hongos transmitidos via semillas son los hongos endófitos. Para probar que el hongo filamentoso (recién aislado) es endófito de *F. arundinacea* se realizó una prueba de endofiticidad. El procedimiento comúnmente utilizado para aislar microorganismos endófitos de plantas es la esterilización superficial del tejido vegetal y su posterior cultivo en cajas de Petri (Hallmann y col., 2006). Huang y col. (2009) aislaron 34 hongos endófitos de tres especies de las plantas *Artemisia capillaris*, *Artemisia indica* y *Artemisia lactiflora* y, recientemente, Kleczewski y col. (2012) aislaron 49 hongos endófitos de semillas, tallos y hojas de diferentes pastos utilizando el procedimiento de esterilización superficial de fragmentos de tejidos vegetales y su posterior cultivo en caja de Petri. En la Figura 11 se muestran las imágenes obtenidas del cultivo de segmentos de raíces de *F. arundinacea* esterilizadas superficialmente, depositadas sobre cajas de Petri con PDA. A partir de 8 días de incubación se observó crecimiento de hifas en los extremos de las raíces, como se puede observar en las Figuras 11 y 12. En la Figura 12 se muestra un acercamiento (6.7X) en donde se observa el crecimiento de hifas en los extremos de los cortes de raíz. A los 20 días de incubación, la colonización del hongo filamentoso fue más evidente (Figura 11). Con esta prueba se demuestra que el hongo filamentoso es endófito de *F. arundinacea*.

8 días de incubación

20 días de incubación

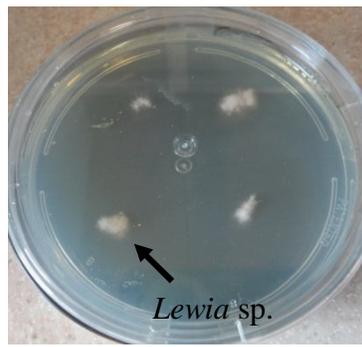
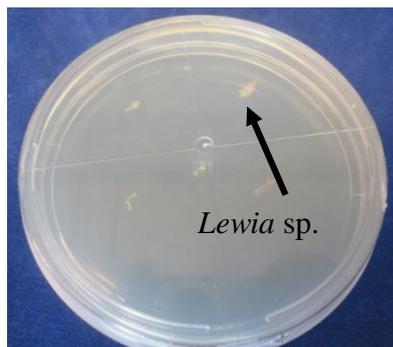
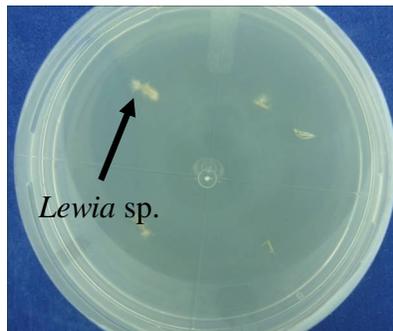


Figura 11. Cultivo en PDA de raíces superficialmente esterilizadas de *F. arundinacea*, después de 8 y 20 días de incubación a 30°C.

8 días de incubación (6.7X)

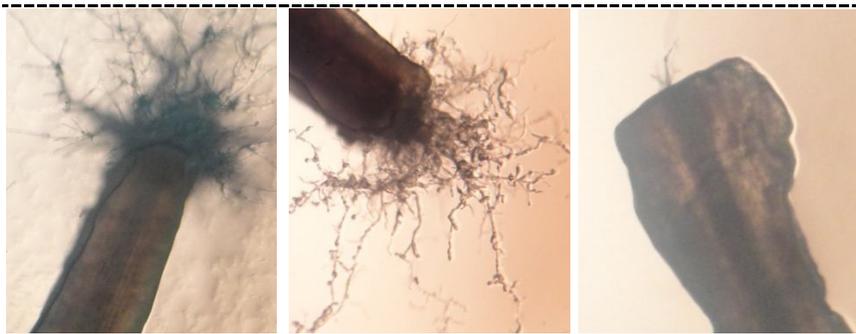


Figura 12. Colonización del hongo filamentoso, dentro de los tejidos de las raíces de *F. arundinacea*, después de 8 días de cultivo, bajo condiciones asépticas.

6.1.2 Respuestas fitopatógenas

Los hongos endófitos no necesariamente son benéficos para las plantas, el termino endófito también puede ser usado para microorganismos parásitos, patógenos y mutualistas (Schulz y Boyle, 2006). Algunos autores determinan que un hongo endófito es fitopatógeno realizando pruebas bioquímicas (Gazis y col., 2010); por ejemplo, cuantificando metabolitos secundarios incluyendo péptidos, proteínas y compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos carboxílicos) que con frecuencia se han asociado con la defensa química de las plantas contra los microorganismos y como moléculas señal en las interacciones planta-microorganismo endófito (Ponce y col., 2009). Sin embargo, basándonos en los alcances de este proyecto, para descartar que el hongo filamentoso a utilizar fuera un microorganismo patógeno, se decidió evaluar en condiciones asépticas las posibles respuestas fitopatógenas derivadas de la presencia del hongo, después de 60 días de cultivo en medio MS, utilizando como variable de respuesta cambios morfológicos en la planta. Debido a que los endófitos benéficos una vez dentro de la planta residen en tejidos específicos dando como resultado cambios morfológicos favorables (Schulz y Boyle, 2006). Cabe señalar que se usó exitosamente el mismo medio de cultivo (con requerimientos específicos para plantas) para crecer al hongo filamentoso. La Figura 13 (a y c) muestra cambios morfológicos visibles en las plantas en presencia del hongo: se observó un incremento en el grosor de la parte aérea y las raíces de la planta inoculada en

comparación con las plantas no inoculadas, como se observa en la Figura 13 (b y d). Estos resultados muestran que la inoculación del hongo filamentoso tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento de raíces y brotes. Nuestros resultados coinciden con los reportados por Soleimani y col. (2010a): *Festuca alta* infectada con *Neotyphodium coenophialum* presentó mayor biomasa de raíces y brotes después de siete meses de crecimiento en suelo contaminado con hidrocarburos. Con los resultados anteriores se podría concluir que el hongo filamentoso no es patógeno de *F. arundinacea*, al menos durante el período de 60 días de cultivo, bajo condiciones asépticas.

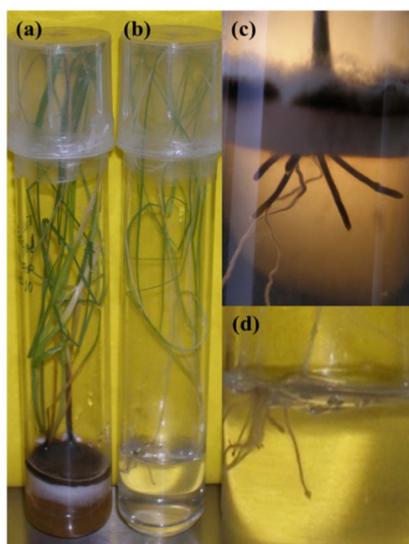


Figura 13. *F. arundinacea* en medio MS. (a) con el hongo filamentoso (b) sin el hongo. Acercamiento de las raíces en medio MS: (c) con el hongo (d) sin el hongo, después de 60 días de cultivo en todos los casos.

Debido al incremento en el grosor de las raíces inoculadas con el hongo (Figura 13 c), se decidió realizar, adicionalmente, cortes transversales de las raíces de *F. arundinacea*, con y sin hongo, que se muestran en la Figura 14. De manera cualitativa se observa que el hongo se aloja en el espacio intercelular de los tejidos de la raíz, sugiriendo que el hongo filamentoso establece una interacción endófito con *F. arundinacea*.

Raíces sin inocular

Raíces inoculadas con el hongo
filamentoso

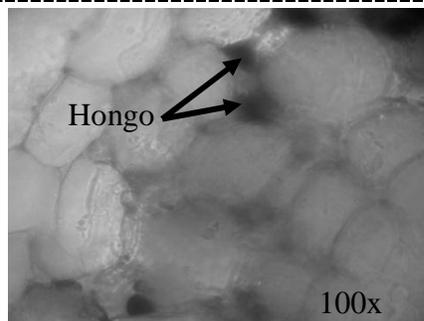
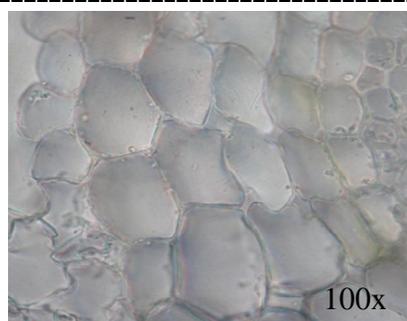
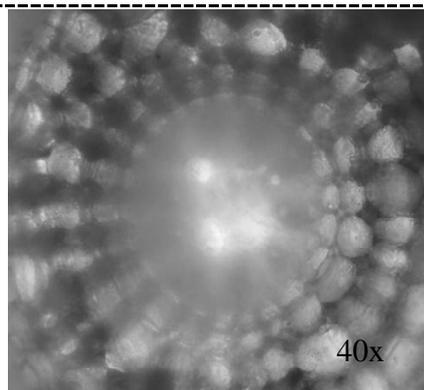
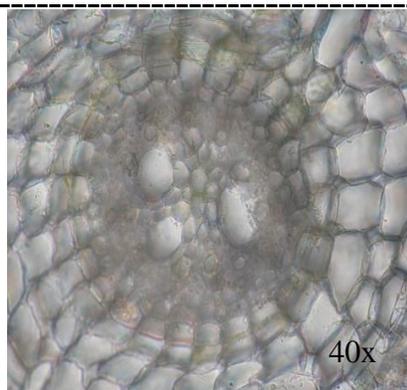


Figura 14. Cortes transversales de raíces de *F. arundinacea*, inoculadas y no inoculadas con el hongo filamentoso, después de 60 días de cultivo en condiciones asépticas.

6.1.3 Identificación del hongo

Los microorganismos generalmente son identificados en primera instancia por sus características morfológicas. La identificación del hongo filamentoso se fundamentó en (i) la morfología macroscópica de las colonias (ii) la morfología microscópica y (iii) el análisis de la secuencia de nucleótidos en las regiones ITS (internal transcribed spacers) del rDNA. En la Figura 15 se muestra una imagen de la morfología macroscópica del hongo filamentoso después de incubarse 14 días en PDA: se observa que la colonia es de color rosa, con textura algodonosa y con algunos relieves ligeros en la periferia. Otra característica macroscópica relevante de esta cepa, después de 15 días de crecimiento, es que por la parte inferior se observaron bordes de color café en el centro. En la Figura 16 se muestra la morfología microscópica de la cepa en PDA a 30°C después de 60 días de crecimiento. Este resultado se comparó con el reportado por Kawasna y Kosiak (2003) de un hongo aislado de granos de avena (*Lewia avenicola*) incubado en el mismo medio a

25°C durante 8 días; esta comparación fue la primera evidencia de que el hongo recién aislado pertenecía al género *Lewia*. Al analizar las secuencias ITS y los fragmentos de genes rDNA con las disponibles en la base de datos del NCBI se encontró una similitud del 100% con la secuencia con entrada EF432279.1, perteneciente a una cepa del género *Lewia*. Las 555 pares de bases fueron los siguientes:

```
TTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGGTTGA  
AAAAAAGGCTTGCTGGACGCTGACCTTGGCTGGCGAAGAGCGCGACTTGTGCT  
GCGCTCCGAAACCAGTAGGCCGGCTGCCAATGACTTTAAGGCGAGTCTCCAGC  
GAACTGGAGACAAAAGACGCCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATG  
ACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAA  
AGATTGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACGTATCGCATTTCGCTG  
CGTTCCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTAAT  
TACGTTGTTACTGACGCTGATTGCTATTGCAAAAAGGTTTGTGGTTGGTCCTGAG  
GGCGGGCGAGCCCACCCAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAAGACACGGGTGAAT  
AATTCAGCAGGGCCGGCCCCGCCGCGCACGCCGTGAAGCAGTGCCCAGCGGGG  
GGTGTCCAGCCCGCCTGGTTATT.
```

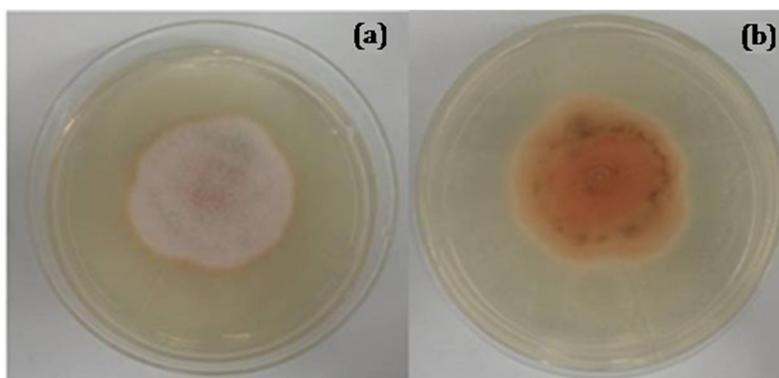


Figura 15. Morfología macroscópica del hongo filamentoso, después de 14 días de crecimiento en PDA. (a): vista superior. (b): vista inferior.

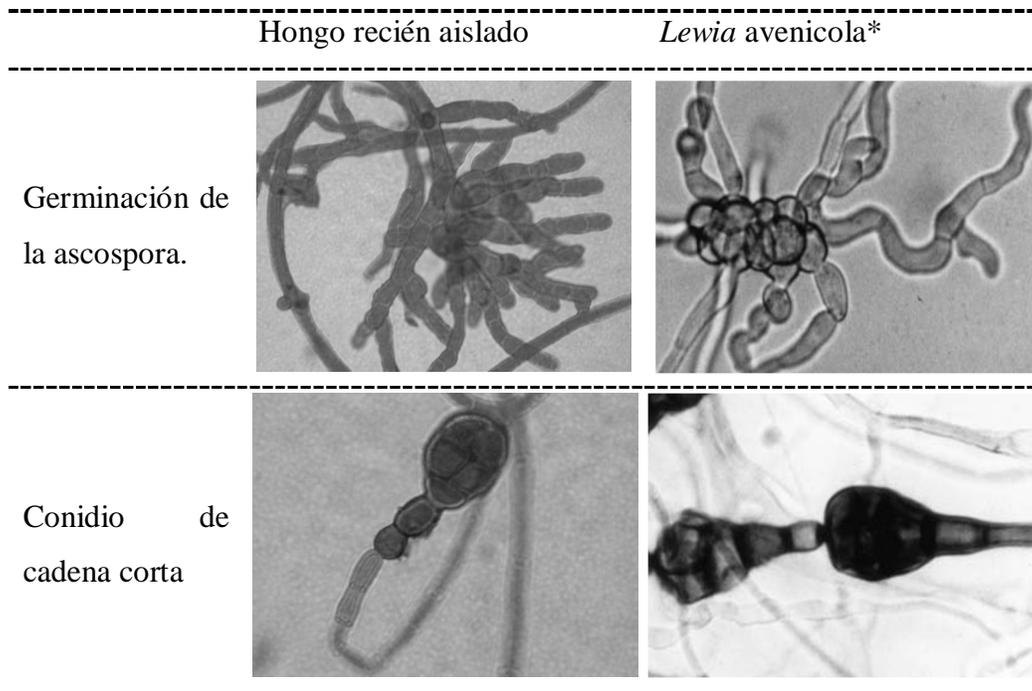


Figura 16. Morfología microscópica (100 X) del hongo filamentososo, después de 60 días de cultivo a 30°C y *Lewia avenicola* después de 8 días de cultivo a 25°C, ambos incubados en PDA. *imágenes obtenidas de Kawasna y Kosiak (2003).

6.1.4 Evaluación de la capacidad de *Lewia* sp., para remover y mineralizar hidrocarburos.

El uso de microorganismos endófitos, capaces de remover y mineralizar contaminantes orgánicos como inoculantes en plantas para mejorar la aplicabilidad y eficiencia de la fitorremediación, puede considerarse como un potencial biotecnológico. En el presente trabajo se reconoció a *Lewia* sp. como un hongo endófito que favoreció el crecimiento de *F. arundinacea* bajo condiciones asépticas. Sin embargo, para fines de fitorremediación, se consideró importante saber si tenía la capacidad de remover y mineralizar hidrocarburos por sí mismo, y de esta manera no sólo trabajar con un hongo que favorezca el crecimiento de la planta, sino también que tenga también la capacidad de usar como única fuente de carbono y energía los hidrocarburos en estudio. Por esta razón, se evaluó la capacidad para remover hidrocarburos con una concentración inicial de 10000 mg MHC (kg de agrolita seca)⁻¹ en el suelo modelo durante 17 días de cultivo. Li y col. (2012) reportan que la fitorremediación asistida por microorganismos se ha enfocado principalmente al uso de bacterias endófitas y poco se sabe acerca de los hongos endófitos. Estudios recientes (Wang y Dai, 2011) sugieren que uno de los mecanismos de defensa de las plantas, como la producción de moléculas fungicidas, es anulado por los hongos endófitos mediante cambios en la conformación tridimensional de estas moléculas, permitiendo con esto la colonización de la planta. Por ejemplo, Chen y col. (2011) encontraron que el endófito *Phomopsis liquidambari* puede producir enzimas para degradar ácidos fenólicos liberados por la descomposición del follaje. Por esto, es posible inferir que los endófitos son capaces de transformar o mineralizar aquellos compuestos que le son tóxicos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Como se aprecia en la Figura 17, *Lewia* sp. removió 36.6%, 59.7 y 73.2% de la concentración inicial de HXD, PHE y PYR, respectivamente. El total de carbono removido en la MHC corresponde a 7.55 mg de carbono (g de soporte)⁻¹. En el supuesto de que este carbono fuera mineralizado en su totalidad produciría 3.8 mg de CO₂ (g soporte)⁻¹ que corresponde al CO₂ teórico total producido. En la Figura 18 se muestra que antes del día tres, la tasa de producción de CO₂ fue significativamente mayor y después del día seis la producción de CO₂ fue casi nula hasta finalizar el cultivo. La máxima producción de CO₂ fue de 2.7 mg CO₂ (g soporte)⁻¹, lo cual indica que, con respecto a total

de mg de carbono removidos, el 71% fue mineralizado. Con los resultados de este experimento se puede concluir que *Lewia* sp. mostró la capacidad de mineralizar hidrocarburos bajo condiciones estériles.

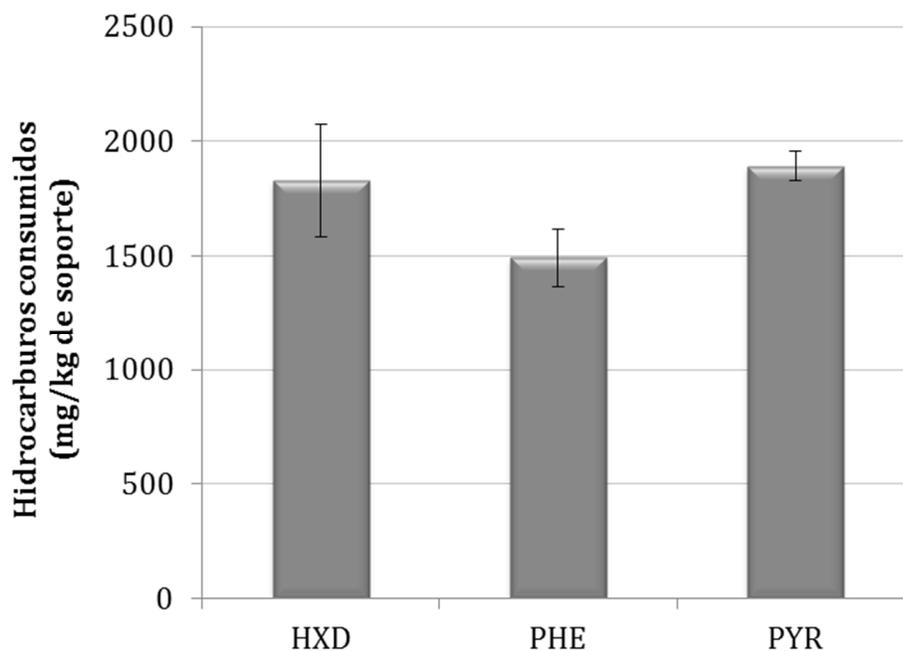


Figura 17. Capacidad del hongo filamentoso para remover hidrocarburos, cultivado en suelo modelo con 5000 mg HXD, 2500 mg PHE y 2500 mg PYR (kg de agrolita seca)⁻¹ durante 17 días de cultivo, en condiciones asépticas.

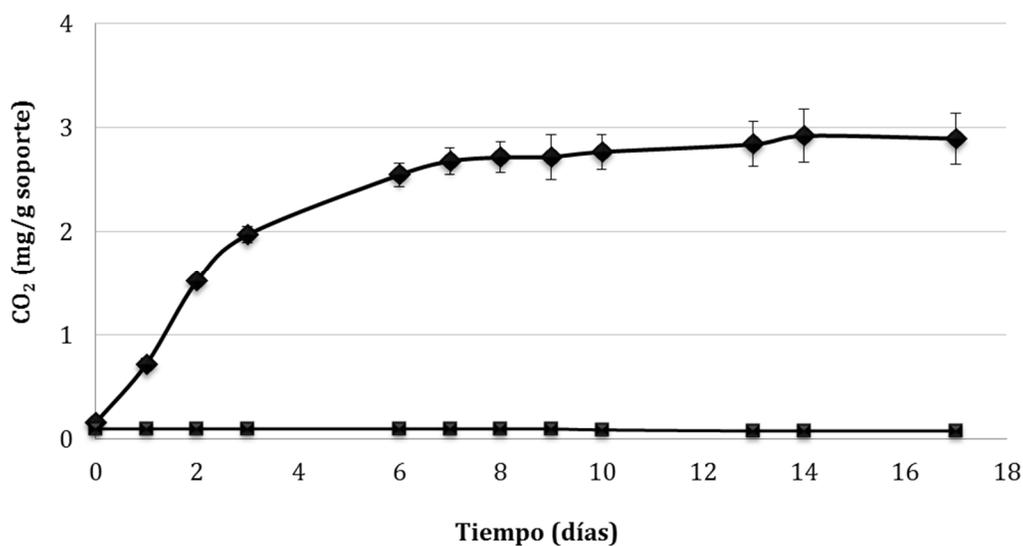


Figura 18. Evolución de CO₂ del hongo filamentoso con 10000 mg MHC (kg de agrolita seca)⁻¹ (◆) y control sin hongo (■), durante 17 días de crecimiento en condiciones asépticas.

6.2 Planta-hongo

Los resultados que se detallan a continuación fueron publicados en el artículo: Cruz-Hernández A., Tomasini-Campocosio A., Pérez-Flores L. J., Fernández-Perrino F. J., Gutiérrez-Rojas M. 2013. Inoculation of seed-borne fungus in the rhizosphere of *Festuca arundinacea* promotes hydrocarbon removal and pyrene accumulation in roots. *Plant and Soil*. **362**:261-270. Ver Apéndice IV.

6.2.1 Respuesta fenológica

Los microorganismos tienen una marcada influencia sobre el crecimiento de las plantas. Un campo prometedor para explotar la interacción planta-endófito es la remediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos. Entre otras funciones, muchos de los microorganismos endófitos ayudan a contrarrestar el estrés causado por los contaminantes, de esta manera, favorecen el crecimiento de las plantas en las que se hospedan (Weyens y col., 2009). En el presente trabajo se evaluó el efecto de *Lewia* sp. sobre el crecimiento de *F. arundinacea* después de 45 días de cultivo en suelo modelo o suelo (con y sin MHC). La primera variable de respuesta que se midió fue la longitud de la parte aérea de *F. arundinacea* (Figura 19). Se observó una disminución ($27.8 \pm 5.3\%$) en la longitud de la parte aérea de *F. arundinacea* por efecto de los hidrocarburos en suelo modelo contaminado con 1500 mg de MHC (kg de medio)⁻¹ en comparación con el control (sin MHC), independientemente de la presencia o ausencia de *Lewia* sp. Por otro lado, no se observó efecto significativo en el crecimiento de la parte aérea de *F. arundinacea* debido a la presencia de *Lewia* sp. en ninguno de los dos casos, suelo modelo y suelo. La segunda variable de respuesta fue la biomasa. En la Figura 20 se muestran los datos de biomasa de raíces producida después de 65 días de cultivo en suelo modelo y suelo contaminado con hidrocarburos y en la Figura 21 los datos relativos a la biomasa de la parte aérea de *F. arundinacea*, en presencia y ausencia de *Lewia* sp. La presencia de hidrocarburos en el suelo modelo y suelo tuvieron un efecto negativo en la producción de la biomasa de parte aérea y de las raíces, con y sin hongo. La presencia de *Lewia* sp. en el suelo modelo contrarrestó el efecto negativo de los hidrocarburos en la producción de biomasa de raíces.

Soleimani y col. (2010a), demostraron que *F. arundinacea* infectada con *Neotyphodium coenophialum* (hongo endófito) produce más biomasa, en comparación con una planta no infectada, ambas en suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo.

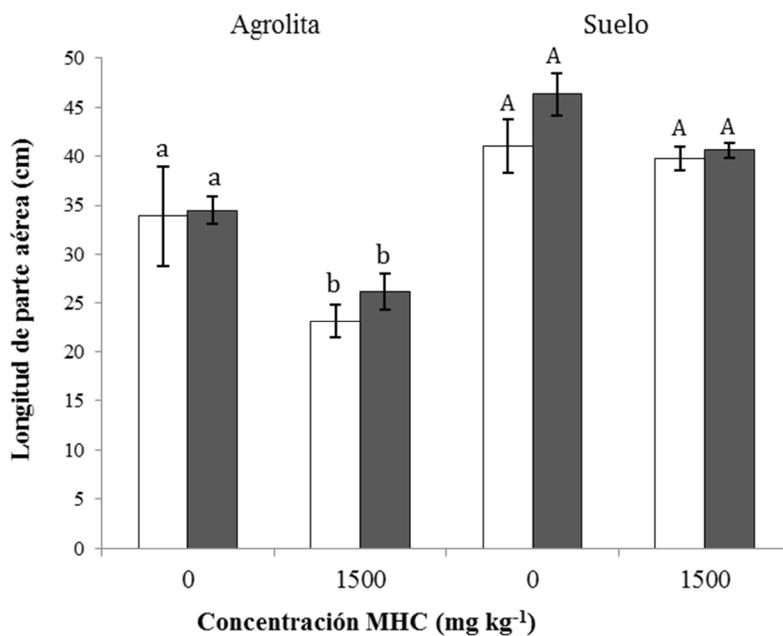


Figura 19. Efecto de la inoculación de *Lewia* sp. en la longitud de la parte aérea de *F. arundinacea* después de 45 días de crecimiento en suelo modelo y suelo contaminados artificialmente con HXD, PHE y PYR, ■ con y □ sin *Lewia* sp. Letras diferentes (mayúsculas para suelo y minúsculas para suelo modelo) representan diferencias significativas de acuerdo a la prueba Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$). Medias de tres replicas \pm DS.

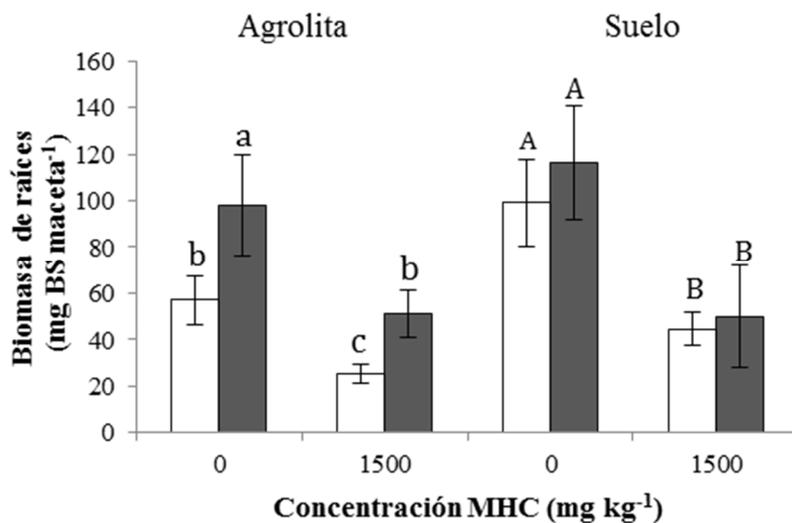


Figura 20. Efecto de la inoculación de *Lewia* sp., en la biomasa de raíces de *F. arundinacea*, después de 45 días de crecimiento en suelo modelo y suelo contaminados artificialmente con HXD, PHE y PYR, ■ con y □ sin *Lewia* sp. Letras diferentes (mayúsculas para suelo y minúsculas para suelo modelo) representan diferencias significativas de acuerdo a la prueba Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$). Medias de tres replicas \pm DS.

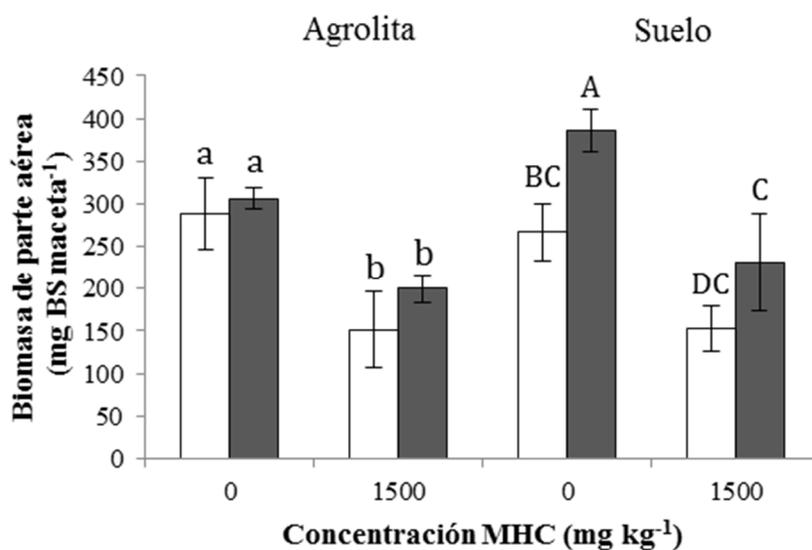


Figura 21. Efecto de la inoculación de *Lewia* sp., en la biomasa de la parte aérea de *F. arundinacea*, después de 45 días de crecimiento en suelo modelo y suelo contaminados artificialmente con HXD, PHE y PYR, ■ con y □ sin *Lewia* sp. Letras diferentes (mayúsculas para suelo y minúsculas para suelo modelo) representan diferencias significativas de acuerdo a la prueba Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$). Medias de tres replicas \pm DS.

6.2.2 Remoción de hidrocarburos

El uso de plantas y su asociación con microorganismos, tales como los hongos endófitos, es una tecnología prometedora para la remediación de suelos contaminados. Los microorganismos endófitos, además del efecto positivo que tienen en el crecimiento de las plantas, se han considerado un potencial biotecnológico porque favorecen la eficiencia de la fitorremediación (Weyens y col., 2009). Con el objeto de corroborar que el hongo tenía algún efecto en la remoción de los hidrocarburos en estudio, se inoculó una suspensión del micelio (*Lewia* sp., hongo endófito) en la rizosfera de *F. arundinacea*, en suelo y suelo modelo. Después de 45 días de cultivo, en la Tabla 8 se muestra que la mayor remoción para los tres hidrocarburos fue en suelo con planta, independientemente de la presencia del hongo, en comparación con el control (suelo sin planta). Como ya varios estudios reportan, la eficiencia de remoción de los HAP es mayor en suelos plantados en comparación con los suelos sin plantar (Soleimani y col., 2010a; Banks y col., 2003). En la Tabla 8 también se muestra que *F. arundinacea* inoculada con *Lewia* sp. favoreció la remoción de HAP, comparado con la planta sola; además las plantas inoculadas con *Lewia* sp. muestran la máxima remoción de PHE (100%), en comparación con las plantas no inoculadas (ambos resultados después de 45 días de cultivo en suelo y suelo modelo). Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Soleimani y col. (2010a), quienes reportaron que *F. arundinacea* inoculada con *Neotyphodium coenophialum* fue capaz de remover todo el PHE inicial después de siete meses de crecimiento en suelo. En nuestro trabajo, la remoción de PYR (hidrocarburo compuesto por cuatro anillos aromáticos fusionados) fue significativamente superior cuando se compararon las plantas inoculadas con *Lewia* sp. (97.9%) con las no inoculadas (91.4%) después de 45 días de cultivo en suelo. Por otra parte, la remoción de PYR fue 37 veces mayor en suelo modelo con planta e inoculado con el hongo en comparación con el control (sin planta y con hongo). De acuerdo a Lugtenberg y col. (2002), y basándose en sus efectos sobre la planta, los rizorremediadores son microorganismos benéficos, a menudo usados como inoculantes para favorecer la fitorremediación de contaminantes orgánicos. Nuestros resultados sugieren que *Lewia* sp. puede ser clasificado como un microorganismo rizorremediador, porque favorece la remoción de PYR (hidrocarburo de alto peso molecular) por *F. arundinacea*.

Tabla 8. Efecto de la inoculación con *Lewia* sp., en la remoción de hexadecano, fenantreno y pireno por *F. arundinacea* después de 45 días de cultivo en suelo modelo y suelo.

	Suelo modelo			Suelo		
	Remoción (%)			Remoción (%)		
	PYR	PHE	HXD	PYR	PHE	HXD
Control	2.7±2.4 b	80.1±3.4 b	76.0±1.2 b	66.8±3.7 C	66.0±0.6 D	65.6±3.1 B
<i>Lewia</i> sp.	9.5±5.6 b	82.2±4.0 b	78.8±1.3 b	69.9±1.2 C	73.7±0.2 C	60.4±7.8 B
<i>F. arundinacea</i>	1.9±0.7 b	85.2±4.1 b	74.5±6.8 ba	91.4±1.2 B	91.9±0.1 B	94.2±1.4 A
<i>F. arundinacea</i> – <i>Lewia</i> sp.	70.3±7.2 a	100±0.0 a	91.7±6.9 a	97.9±0.8 A	99.9±0.1 A	95.1±0.8 A
Masa inicial (mg UE ⁻¹)	12.7±1.4	12.3±1.5	24.6±2.8	124.8±3.9	111.6±8.9	176.4±8.0

Letras diferentes (mayúsculas para suelo y minúsculas para suelo modelo) representan diferencias significativas entre tratamientos: *Lewia* sp.; *F. arundinacea*, *F. arundinacea* - *Lewia* sp. y el control (suelo modelo o suelo) para cada hidrocarburo. Las medias fueron comparadas de acuerdo a la prueba Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$). UE: unidad experimental.

6.2.3 Destino final de hidrocarburos

La información acerca del destino final de los hidrocarburos es esencial para deducir los posibles mecanismos que utiliza una planta para remediar suelos contaminados, lo que permite predecir la efectividad de la fitorremediación (Gao y Ling, 2006). La primera consideración para la fitorremediación es seleccionar una planta capaz de absorber los contaminantes orgánicos del suelo, vía el sistema radicular (Schröder, 2007). Después de la absorción por la planta, el compuesto orgánico puede ser metabolizado y/o liberado a la atmósfera, a través de la evapotranspiración o también puede ser secuestrado en las raíces o parte aérea. En la Tabla 9 se muestra la acumulación de HXD, FEN y PYR en raíces y parte aérea de *F. arundinacea*, después de 45 días de cultivo en suelo modelo y suelo (con y sin la inoculación de *Lewia* sp.). De una concentración inicial de 24.6 mg de HXD (unidad experimental)⁻¹ adicionada al suelo modelo, del 91.7% que fue removido después de 45 días de crecimiento en presencia de *Lewia* sp. sólo el 0.27% y 0.31% fue localizado en las parte aérea y raíces, respectivamente. En el caso del suelo, de una concentración inicial de 176.4 mg de HXD (unidad experimental)⁻¹, menos del 0.05% (del 95.1% que fue removido) fue localizado, tanto en raíces como parte aérea. Esto puede explicarse porque de los tres hidrocarburos estudiados, el HXD puede ser degradado más fácilmente. De acuerdo a Reynoso-Cuevas y col. (2011), *F. arundinacea* tiene la capacidad de acumular 46.7 y 15.95 mg de PYR (kg tejido seco)⁻¹ en raíces y parte aérea, respectivamente. En el presente estudio, después de 45 días de cultivo en suelo modelo, la acumulación de PYR en raíces de *F. arundinacea* inoculada con *Lewia* sp., fue 6.8 veces más alta en comparación con los resultados de Reynoso-Cuevas y col. (2011). De igual manera, la presencia del hongo estimuló la translocación de PYR de raíces a la parte aérea.

Cuando el suelo fue usado como soporte se obtuvieron respuestas diferentes: no se encontraron diferencias significativas en la concentración de PYR en las raíces entre las plantas inoculadas y las no inoculadas con *Lewia* sp., probablemente debido a que el hongo inoculado fue desplazado por los microorganismos nativos del suelo antes de que pudiera penetrar en las raíces de *F. arundinacea*. En la parte aérea el PYR no fue detectado, independientemente de la presencia del hongo, lo que concuerda con lo reportado por Su y col. (2008), quienes describieron que el PYR no fue detectado en la parte aérea de *F.*

arundinacea después de ocho semanas de crecimiento en suelo. Este comportamiento puede explicarse porque el *Kow* del PYR es 5.18, al ser un valor superior a 4 teóricamente debería ser absorbido por las raíces; aunque en este caso con una lenta o nula translocación a la parte aérea. La presencia de HXD y PYR en los tejidos de la planta indica que el mecanismo de fitorremediación estimulado en la degradación de hidrocarburos por la interacción *F. arundinacea*-hongo endófito (*Lewia* sp.) fue la fitodegradación. Además, en el caso del suelo modelo, la acumulación de PYR en raíces sugiere que *Lewia* sp. (alojado entre las células de las raíces) podría tener la capacidad de seguir con la transformación de los contaminantes orgánicos que se encuentran secuestrados.

Tabla 9. Efecto de la inoculación con *Lewia* sp., en la acumulación de hexadecano, fenantreno y pireno en raíces y parte aérea de *F. arundinacea* después de 45 días de cultivo en suelo modelo y suelo.

	Suelo modelo			Suelo		
	PYR	PHE	HXD	PYR	PHE	HXD
	mg kg ⁻¹			mg kg ⁻¹		
Raíces	n. d.	n. d.	n. d.	694.7±246	n. d.	1,603.4±84.7
Raíces (Con <i>Lewia</i> sp.)	318±162	n. d.	490±300	1,603.4±335.9	n. d.	1,404.3±56
Parte aérea	n. d.	n. d.	445±11	n. d.	n. d.	309±103
Parte aérea (Con <i>Lewia</i> sp.)	20.7±6.9	n. d.	358.8±26	n. d.	n. d.	136.5±79
Conc. Inicial *mg kg ⁻¹	357.8±27	328.5±38.5	639±96.2	317.9±8.0	284.2±20.9	451.7±26.9

n.d. no detectado

mg hidrocarburo kg⁻¹ BS, raíces y parte aérea.

*mg hidrocarburos kg⁻¹ soporte seco, suelo modelo o suelo

Medias de tres replicas ± IC

6.2.4 Crecimiento de Festuca arundinacea-Lewia sp. en suelo con hidrocarburos totales del petróleo

La implementación de estrategias de remediación *in situ* para ambientes contaminados ha incrementado considerablemente en los últimos tiempos (Gan y col., 2009; Dugalic y col., 2010). La fitorremediación es una tecnología amigable con el ambiente, que utiliza plantas y su asociación con los microorganismos para remediar suelos contaminados. En este trabajo se aplicó en campo una estrategia de fitorremediación implementada a nivel laboratorio, con la finalidad de evaluar la supervivencia y cambios morfológicos de *F. arundinacea*, en presencia y ausencia de *Lewia sp.*, en un suelo previamente remediado y bajo condiciones ambientales. La Figura 22 muestra imágenes de *F. arundinacea* inoculada y no inoculada con *Lewia sp.*, creciendo en una parcela con cuatro toneladas de suelo contaminado con petróleo de la ex refinería 18 de Marzo. A los 40 días, la supervivencia de las plantas sin hongo trasplantadas fue mayor (44%) en comparación con las plantas inoculadas con *Lewia sp.* (30%). La baja supervivencia puede deberse a los cambios ambientales extremos que se presentaron durante los días de trasplante. A pesar de la baja supervivencia, después de 80 días las plantas sin inocular ya presentaban inflorescencia y a los 120 días de cultivo se recolectaron semillas. Además, se pudo observar de manera cualitativa que, después de los 120 días, las plantas inoculadas con hongo eran más saludables y vigorosas en comparación con las plantas sin inocular. Por otro lado, las plantas inoculadas con *Lewia sp.* presentaron inflorescencia hasta los 120 días y se colectaron semillas hasta los 180 días. Nabors (2006) reporta que la producción de semillas facilita la supervivencia de las plantas, ayudando a superar períodos difíciles, las estaciones con temperaturas extremas o ausencia de humedad. Esto podría explicar por qué las plantas inoculadas con *Lewia sp.* tardaron más tiempo en producir semillas: probablemente no se encontraban amenazadas durante la época de crecimiento y no había necesidad de asegurar su supervivencia. Después de los 180 días, se tomaron muestras de las raíces de *F. arundinacea* y se observaron cambios morfológicos: las raíces con hongo eran más gruesas y menos ramificadas en comparación con las raíces sin hongo, que eran más delgadas y ramificadas, como se observa en la Figura 23.



Figura 22. Registro fotográfico del crecimiento de *Festuca arundinacea* inoculada y no inoculada con *Lewia* sp., en suelo contaminado y previamente remediado de la ex Refinería 18 de marzo, en parcelas experimentales en la UAM-I. (a) 40; (b) 80; (c) 120; (d) 180; (e) 340 y (f) 540 días de crecimiento.



Figura 23. Morfología macroscópica de las raíces de *F. arundinacea* inoculadas (a) y no inoculadas con *Lewia* sp. (b) después de 180 días de crecimiento en suelo contaminado y

previamente remediado de la ex Refinería 18 de marzo, en parcelas experimentales en la UAM-I.

6.2.5 Remoción de hidrocarburos totales del petróleo por la interacción *F. arundinacea* - *Lewia* sp.

Se ha demostrado que los microorganismos endófitos tienen un papel importante en la adaptación de la planta a los ambientes contaminados, y de esta manera favorecen la fitorremediación promoviendo el crecimiento de la planta y disminuyendo la fitotoxicidad de los contaminantes en el suelo (Li y col., 2012). Sin embargo, no hay reportes de la aplicación *in situ* de la fitorremediación asistida por microorganismos endófitos en condiciones de campo. En la Tabla 10 se muestra la remoción de HTP por la interacción *F. arundinacea* - *Lewia* sp., en suelo de la ex Refinería 18 de marzo y condiciones de campo. Después de 540 días de cultivo, no se observaron diferencias significativas en la remoción de HTP por *F. arundinacea* inoculada con *Lewia* sp., y la planta sola. Además, hasta el tiempo que se prolongó el experimento, la concentración inicial de hidrocarburos (fracción pesada y media) se mantuvo prácticamente sin cambios. Este resultado podría deberse a cualquiera de los siguientes supuestos: (i) el tiempo de fitorremediación fue breve, Kamath y col. (2004) reportan que la aplicación en campo de la fitorremediación puede ser monitoreada hasta cinco años, o (ii) la técnica de inoculación del hongo no fue la adecuada, de tal manera que éste fue desplazado antes de penetrar las raíces de *F. arundinacea*. Para corroborar que el hongo se encontraba dentro de la planta, se colectaron 40 semillas durante el cultivo de la planta en la parcela (20 semillas obtenidas de las plantas inoculadas con hongo y 20 de plantas sin hongo). Las semillas se germinaron en tubos de cultivo (apartado 5.5.4). Después de 20 días de haber germinado las semillas, no se observó crecimiento de ningún tipo de hongo. En este apartado se concluye que hace falta establecer las condiciones para la inducción de la asociación entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. en pruebas de campo.

Tabla 10. Remoción de hidrocarburos totales del petróleo por la interacción *F. arundinacea* - *Lewia* sp., creciendo en suelo de la ex Refinería 18 de marzo después de 540 días de crecimiento.

	Remoción (mg kg BS ⁻¹)	
	Fracción media	Fracción pesada
<i>F. arundinacea</i>	277.7 ± 0.7 a	1032.2 ± 80.8 A
<i>F. arundinacea</i> - <i>Lewia</i> sp.	305.1 ± 27.5 a	999.5 ± 34.9 A
Masa inicial	416.31 ± 81.29	1183.29 ± 183.30

Letras diferentes (minúsculas para fracción media y mayúsculas para pesada) representan diferencias significativas entre tratamientos: *F. arundinacea*, *F. arundinacea* -*Lewia* sp. Las medias fueron comparadas de acuerdo a la prueba Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$). Datos analizados por Intertek Testing Service de México S. A. de C. V. Media ± DS, n=2.

7. CONCLUSIONES

- El hongo filamentoso aislado de las semillas de *F. arundinacea* fue identificado como *Lewia* sp.
- Se demostró que *Lewia* sp. es un hongo endófito de *F. arundinacea* y que esta interacción es inducible en el laboratorio.
- Se encontró que el endófito *Lewia* sp. tiene la capacidad de mineralizar hidrocarburos utilizando agrolita como soporte bajo condiciones estériles.
- *Lewia* sp. promovió la producción de biomasa de las raíces de *F. arundinacea* después de 45 días de cultivo en agrolita como suelo modelo.
- La presencia de *Lewia* sp. favoreció la remoción de pireno (hidrocarburo tóxico de alto peso molecular) por *F. arundinacea* después de 45 de cultivo, en suelo modelo y suelo.
- La presencia de *Lewia* sp. favoreció la acumulación de pireno en las raíces de *F. arundinacea*, después de 45 días de cultivo en agrolita como suelo modelo.
- El mecanismo de fitorremediación que se estimuló en la degradación de hidrocarburos por la interacción *F. arundinacea*-*Lewia* sp. fue fitodegradación.
- El cultivo de *F. arundinacea* inoculada con *Lewia* sp. en suelo contaminado de la ex-Refinería 18 de Marzo, nos permitió concluir lo siguiente:
 - ✓ La supervivencia de *F. arundinacea* fue mayor (40%) en comparación con las plantas inoculadas con *Lewia* sp. (30%).
 - ✓ La inflorescencia fue 5 veces mayor en plantas sin hongo en comparación con las plantas inoculadas.

-
- ✓ Se observaron cambios en la morfología de las raíces de *F. arundinacea* inoculadas con *Lewia* sp., en comparación con las plantas no inoculadas.
 - ✓ No se observaron diferencias significativas en la remoción de hidrocarburos totales del petróleo por *F. arundinacea* inoculada y no inoculada con *Lewia* sp., probablemente debido a que no se estableció la asociación entre la planta y el hongo.

8. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se recomienda para estudios posteriores lo siguiente:

Estudiar los metabolitos generados por el hongo endófito para favorecer el crecimiento de la planta en la fitorremediación de contaminantes orgánicos, tales como la producción de hormonas (sobre todo aquellas que están implicadas en el crecimiento de las plantas, por ejemplo auxinas y giberelinas) o enzimas que modifiquen la estructura de ácidos nucleicos, lípidos y proteínas esenciales para la vida celular.

Se conocen estudios que reportan la actividad antioxidante que ejercen los individuos endófitos en los huéspedes colonizados. En muchos casos, los cambios en la producción de especies reactivas de oxígeno y la actividad antioxidante aumentan en la asociación simbiótica benéfica. Sería importante evaluar las respuestas antioxidantes que puedan contribuir al conocimiento y comprensión del éxito de la colonización endofítica y su correlación con las respuestas de la planta hospedera durante la fitorremediación de compuestos orgánicos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acevedo F., Pizzul L., Castillo M. P. González M. E., Cea M. Gianfreda L. Diez M. C. 2010. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by free and nanoclay-immobilized manganese peroxidase from *Anthracophyllum discolor*. *Chemosphere*. **80**:271-218.

Anderson I. C., Cairney J. W. 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*. **6**:769-779.

Andria V., Reichenauer T. G., Sessitsch A. 2009. Expression of alkane monooxygenase (alkB) genes by plant-associated bacteria in the rhizosphere and endosphere of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) grown in diesel contaminated soil. *Environmental Pollution*. **157**:3347-3350.

Aquihuatl M. A., Pérez M. L. 2004. Manual de prácticas del laboratorio de Microbiología general, Departamento de Biotecnología, *Universidad Autónoma Metropolitana*.

Bacon C. W., Yates I. E. 2006. Endophytic root colonization by *Fusarium* species: Histology, Plant Interactions, and Toxicity. In: Schulz, B., Boyle, C., Sieber, T. N. (Eds). *Microbial Root Endophytes*. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. **6**:133-152.

Banks M. K., Schwab P., Liu B., Kulakow P. A., Smith J. S., Kim R. 2003. The effect of plants on the degradation and toxicity of petroleum contaminants in soil: a field assessment. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. **78**: 75-96.

Barac T., Taghavi S., Borremans B., Provoost A., Oeyen L., Colpaert J. V., Vangronsveld J., van der Lelie D. 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile organic pollutants. *Nature Biotechnology*. **22**:583-588.

Begonia M. T., Begonia G. B., Ighoavodha M., Gilliard D. 2005. Lead accumulation by Tall Fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) grown on a lead-contaminated soil. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. **2**:228-233.

Beyer J., Jonsson G., Porte C., Krahn M. M., Ariese F. 2010. Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **30**:224-244.

Cerniglia C. E., Sutherland J. B. 2010. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. In: Timmis K. N. (Ed) Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg*. 2079-2110.

Cheema S. A., Khan M. I., Tang X., Zhang C., Shen C., Malik Z., Ali S., Yang J., Shen K., Chen X., Chen Y. 2009. Enhancement of phenanthrene and pyrene degradation in rhizosphere of tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Journal of Hazardous Material*. **166**:1226-1231.

Chen Y., Peng Y., Dai C., Ju Q. 2011. Biodegradation of 4-hydroxybenzoic acid by *Phomopsis liquidambari*. *Applied Soil Ecology*. **51**:102-110.

Chen Y. C., Banks M. K., Schwab A. P. 2003. Pyrene degradation in the rhizosphere of tall fescue (*Festuca arundinacea*) and switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Environmental Science and Technology*. **37**:5778-5782.

Cruz-Hernández A. 2008. Remoción de hidrocarburos por la interacción planta-hongo filamentoso bajo condiciones *in vitro*. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, México D. F., pp 41.

Deacon J. 2006. Fungal biology. *Blackwell Publishing*. pp 371.

Dugalic G., Krstic D., Jelic M., Nikezic D., Milenkovic B., Pucarevic M., Zeremski-Skoric T. 2010. Heavy metals, organics and radioactivity in soil of western Serbia. *Journal of Hazardous Material*. **177**:697-702.

Gan S., Lau E. V., Ng H. K. 2009. Remediation of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Material*. **172**:532–549.

Gao Y., Ling W. 2006. Comparison for plant uptake of phenanthrene and pyrene from soil and water. *Biology Fertility of Soils*. **42**:387-394.

Gardes M., Bruns T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*. **2**:113-118.

Gawronski S. W., Gawrosnska H. 2007. Plant taxonomy for phytoremediation. In: Samotokin B., Marmiroli M., Marmiroli N. (Eds) Advanced science and technology for biological decontamination of sites affected by chemical and radiological nuclear agents. *Springer, Netherlands*. 79-88.

Gazis R., Chaverri P. 2010. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal ecology*. **3**:240-254.

Gerhardt K. E., Huang X. D., Glick B. R., Greenberg B. M. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science*. **176**:20-30.

Gomez-Eyles J. L., Collins C. D., Hodson M. E. 2010. Relative proportions of polycyclic aromatic hydrocarbons differ between accumulation bioassays and chemical methods to predict bioavailability. *Environmental Pollution*. **158**:278-284.

Hallmann J., Berg G., Schulz B. 2006. Isolation procedures for endophytic microorganisms. In: Schulz B., Boyle C., Sieber T. N. (Eds) Microbial Root Endophytes. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. **6**:299-319.

Haritash A. K., Kaushik C. P. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Material*. **169**:1-15.

Ho C. H., Banks M. K. 2006. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of *Festuca arundinacea* and associated microbial community changes. *Bioremediation Journal*. **10**:93-104.

Huang W. Y., Cai Y. Z., Surveswaran S., Hyde K. D., Corke H., Sun M. 2009. Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species. *Fungal Diversity*. **36**: 69-88.

James C. A., Strand S. E. 2009. Phytoremediation of small organic contaminants using transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*. **20**:237-241.

Kamath R., Rentz J. A., Schnoor J. L., Alvarez P. J. J. 2004. Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils: principles and applications. In: Kamath R., Rentz J. A., Schnoor J. L., Alvarez P. J. J. (Eds) *Petroleum Biotechnology: Developments and Perspectives*. **151**:447-478.

Kawasna H., Kosiak B. 2003. *Lewia avenicola* sp. nov. and its *Alternaria* anamorph from oat grain, with a key to the species of *Lewia*. *Mycology Research*. **107** (3): 371-376.

Khan Z. 2007. Endophyte assisted phytoremediation of trichloroethanol (TCE): an environmental contaminant. *Comparative Biochemical and Physiology*. A. **146**:273-274.

Khan Z., Doty S. 2011. Endophyte-assisted phytoremediation. *Current Opinion in Plant Biology*. **12**:97-105.

Kleczewski N. M., Bauer J. T., Bever J. D., Clay K., Reynolds H. L. 2012. A survey of endophytic fungi of switchgrass (*Panicum virgatum*) in the Midwest, and their putative roles in plant growth. *Fungal Ecology*. 521-529.

Kuldau G., Bacon C. 2008. Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biological Control*. **46**:57-71.

Larena I., Salazar O., González V., Julián M. C., Rubio V. 1999. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology*. **75**:187-194.

Lazcano E. A., Guerrero-Zuñiga L. A., Rodriguez-Tovar A., Rodriguez-Dorantes A., Vasquez-Murrieta M. S. 2010. Rhizospheric plant-microbe interactions that enhance the remediation of contaminated soil. In: Méndez-Vilas A. (Ed) Current research, technology and education topics in applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Microbiology Book Series, *Formatex Research Center*. 251-256.

Li H., Wei D., Shen M., Zhou Z. 2012. Endophytes and their role in phytoremediation. *Fungal Diversity*. **54**:11-18.

Lugtenberg B. J., Chin-A-Woeng T. F., Bloemberg G. V. 2002. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek*. **81**:373-383.

May S. 2011. Phytoremediation a new hope for the environment. The University of Nottingham. Disponible en: <http://arabidopsis.info/students/dom/frameset.html>.

Mohsenzadeh F., Nasser S., Mesdaghinia A., Nabizadeh R., Zafari D., Khodakaramian G., Chehregani A. 2010. Phytoremediation of petroleum-polluted soil: Application of *Polygonum aviculare* and its root-associated (penetrated) fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **73**:613-619.

Muckian L., Grant R., Doley E., Clipson N. 2007. Bacterial community structure in soil contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere*. **68**:1535-1541.

Murashige T., Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. **15**:473-497.

Nabors M. W. 2006. Introducción a la estructura de las plantas. In: Nabors M. W. Introducción a la botánica. *Pearson Education*. 55-79.

Ndimele P. E. 2010. A review on the phytoremediation of petroleum hydrocarbons. *Pakistan Journal Biological Science*. **13**:715-722.

Phillips L. A., Germida J. J., Farrell R. E., Greer C. W. 2008. Hydrocarbon degradation potential and activity of endophytic bacteria associated with prairie plants. *Soil Biology and Biochemistry*. **40**:3054-3064.

Pilon-Smits E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*. **56**:15-39.

Ponce M. A., Bompadre M. J., Scervino J. M., Ocampo J. A., Chaneton E. J., Godeas A. M. 2009. Flavonoids, benzoic acids and cinnamic acids isolated from shoots and roots of Italian rye grass (*Lolium multiflorum* Lam.) with and without endophyte association and arbuscular mycorrhizal fungus. *Biochemical Systematics and Ecology*. **37**:245-253.

Rashid S., Charles T. C., Glick B. R. 2012. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*. **61**:217-224.

ITRC (Interstate Technology & Regulatory Council). 2009. Phytotechnology Technical and Regulatory Guidance and Decision Trees, Revised. PHYTO-3. Washington, D.C.: Interstate Technology & Regulatory Council, Phytotechnologies Team, Tech Reg. Update. www.itrcweb.org

Reynoso-Cuevas L., Gallegos-Martínez M. E., Cruz-Sosa F., Gutiérrez-Rojas M. 2008. *In vitro* evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soils. *Bioresource Technology* .**99**: 6379-6385.

Reynoso-Cuevas L., Gallegos-Martínez M. E., Cruz-Sosa F., Gutiérrez-Rojas M. 2011. Phytoremediation and removal mechanisms in *Bouteloua curtipendula* growing in sterile hydrocarbon spiked cultures. *International Journal of Phytoremediation*. **13**:613-625.

Rognli O. A., Saha M. C., Bhamidimarri S., Heijden S. 2010. Fescues. In: Boller B., Beat; Posselt, Ulrich K.; Veronesi, Fabio (Eds.), Fodder Crops and Amenity Grasses. *Handbook of Plant Breeding*. **5**:261-292.

Schröder P. 2007. Exploiting plant metabolism for the phytoremediation of organic xenobiotics. In: Willey N. (Ed) Phytoremediation: Methods and Reviews. *Humana Press Inc*. **23**:251-263.

Schulz B., Boyle C. 2006. What are Endophytes?. In: Schulz B., Boyle C., Sieber T. N. (Eds) Microbial Root Endophytes. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. **6**:1-13.

Sheng X., Chen X., He L. 2008. Characteristics of an endophytic pyrene-degrading bacterium of *Enterobacter* sp. 12J1 from *Allium macrostemon* Bunge. *International Biodeterioration and Biodegradation*. **62**:88-95.

Siciliano S. D., Germida J. J., Banks K., Greer C: W. 2003. Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation Field Trial. *Applied and Environmental Microbiology*. 483-489.

Soleimani M., Afyuni M., Hajabbasi M. A., Nourbakhsh F., Sabzalian M. R., Christensen J. H. 2010a. Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. *Chemosphere*. **81**:1084-1090.

Soleimani M., Hajabbasi M. A., Afyunia M., Mirlohib A., Borggaard O. K., Holm P. E. 2010b. Effect of endophytic fungi on cadmium tolerance and bioaccumulation by *Festuca arundinacea* and *Festuca pratensis*. *International Journal of Phytoremediation*. **12**: 535-549.

Srogi K. 2007. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environmental Chemistry Letters*. **5**:169-195.

Su Y., Yang X., Chiou C. T. 2008. Effect of rhizosphere on soil microbial community and in-situ pyrene biodegradation. *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China*. **2**:468-474.

Sun M., Fu D., Teng Y., Shen Y., Luo Y., Li Z., Christie P. 2011. In situ phytoremediation of PAH-contaminated soil by intercropping alfalfa (*Medicago sativa* L.) with tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and associated soil microbial activity. *Journal of Soils and Sediments*. **11**:980-989.

Tanaka A., Takemoto D., Chujo T., Scott B. 2012. Fungal endophytes of grasses. *Current Opinion in Plant Biology*. **15**:462-468.

Tarkka M., Schrey S., Hampp R. 2008. Plant associated soil micro-organisms. In: Nautiyal C. S., Dion P. (Eds) *Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence*. Springer Berlin. 3-51.

US EPA (United States Environmental Protection Agency). 2008. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Disponible en <http://www.epa.gov/osw/hazard/wastemin/priority.htm>.

Wang S., Nomura N., Nakajima T., Uchiyama H. 2012. Case study of the relationship between fungi and bacteria associated with high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **113**:624-630.

Wang Y., Dai C. 2011. Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. *Ann. Microbiol.* **61**:207-215.

Wang Y., Li H., Zhao W., He X., Chen J., Geng X., Xiao M. 2010. Induction of toluene degradation and growth promotion in corn and wheat by horizontal gene transfer within endophytic bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*. **42**:1051-1057.

Weyens N., van der Lelie, D., Taghavi S., Vangronsveld J. 2009. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. *Current Opinion in Biotechnology*. **20**:248-254.

Xiao H., El-Alawi Y., Penrose D. M., Glick B. R., Greenberg B. M. 2004. A multi process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environmental Pollution*. **130**:465-476.

Yang Z., Zhu L. 2007. Performance of the partition-limited model on predicting ryegrass uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere*. **67**:402-409.

Yousaf S., Andria V., Reichenauer T. G., Smalla K., Sessitsch A. 2010. Phylogenetic and functional diversity of alkane degrading bacteria associate with Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) and Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) in a petroleum oil-contaminated environment. *Journal of Hazardous Material*. **184**:523-532.

APÉNDICE I

GLOSARIO

Absorción: *Biol.* Proceso mediante el cual el cuerpo absorbe los nutrientes necesarios para continuar con su vida luego de la digestión.

Adsorción: proceso por el cual átomos, iones o moléculas son atrapados o retenidos en la superficie de un material, en contraposición a la absorción, que es un fenómeno de volumen, es decir es un proceso en el cual un contaminante soluble (adsorbato) es eliminado del agua por contacto con una superficie sólida (adsorbente). El proceso inverso a la adsorción se conoce como desorción.

Anamorfo: estado imperfecto de un hongo, solo se reproduce en forma asexual. Fase imperfecta o asexual en los ascomicetos y algunos basidiomicetos.

Aséptico: ausencia de microbios o de infección.

Biodegradación: característica de algunas sustancias químicas para ser utilizadas como sustrato por microorganismos, que las emplean para producir energía (por respiración celular) y crear otras sustancias como aminoácidos, nuevos tejidos y nuevos organismos. Puede emplearse en la eliminación de ciertos contaminantes como los desechos orgánicos urbanos, papel, hidrocarburos, etc.

Biodisponibilidad: se refiere al contacto entre el contaminante y el sistema biológico para inducir cualquier efecto.

Biotransformación: modificación que sufren los contaminantes en su paso a través del organismo.

Destoxificación: liberación de toxinas de un sustrato. La exposición de vegetales y suelos a tóxicos químicos es una fuente gradual de aumento de la toxicidad en el organismo animal

en general, y del ser humano en particular. Las toxinas orgánicas en general y los productos químicos inorgánicos, entre otros, se depositan en los diversos órganos y tejidos, afectando a su funcionamiento, lo que determina finalmente disfunciones o alteraciones del funcionamiento orgánico y genera graves trastornos orgánicos y enfermedades de tipo degenerativo. Después de años de exposición a éstas sustancias tóxicas, el organismo pierde su capacidad normal de eliminarlas, por lo que recirculan al interior del organismo afectado.

Esterilización: método de control (en ciencias de la salud, biología y química) del crecimiento microbiano que involucra la eliminación de todas las formas de vida microscópicas no deseadas en un cultivo controlado, incluidos virus y esporas.

Hidrófilo: comportamiento de toda molécula que tiene afinidad por el agua. Las moléculas hidrófilas son a su vez lipóforas, es decir no tienen afinidad por los lípidos o grasas y no se mezclan con ellas.

Hidrofóbico: comportamiento de toda molécula que no tiene afinidad por el agua.

Mineralización: transformación de una sustancia orgánica en compuestos de naturaleza inorgánica.

Senescencia: El cambio gradual e intrínseco en un organismo que conduce a un riesgo creciente de vulnerabilidad, pérdida de vigor, enfermedad y muerte.

Recalcitrante: compuesto con una estructura química muy estable, por lo que se resiste al ataque de los microorganismos o de cualquier otro mecanismo de degradación sea biológico o químico

Rizosfera: es la fina capa de suelo que se queda adherida al sistema de raíces de las plantas después de sacudirlas. Es donde tiene lugar una interacción dinámica con los

microorganismos. Las características químicas y biológicas de la rizosfera se manifiestan en una porción de apenas 1 mm de espesor a partir de las raíces.

Simbiosis: relación estrecha y persistente entre organismos de distintas especies.

APÉNDICE II



RESULTADOS DE MUESTRAS ANALIZADAS POR INTERTEK TESTING SERVICES LABORATORIOS AMBIENTALES MÉXICO

REPORTE ELABORADO PARA: Universidad Autónoma Metropolitana
San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, México, D.F.

ATENCIÓN: Dr. Mariano Gutiérrez

FECHA DE MUESTREO: 2013-01-30

Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V.
Poniente 134 No. 660, Col. Industrial Vallejo
C.P. 02300, Del. Azcapotzalco, México, D.F. Tel.: 50912150
www.intertek.com

2da Edición Enero 2001, 7a Revisión Septiembre 03, 2010

ILT-A/002/CLS 10-F3



REPORTE DE RESULTADOS

Empresa: Universidad Autónoma Metropolitana **No. de Orden de Trabajo:** 2013-MEXC-000209
Dirección: San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, México, D.F. **Fecha de Reporte:** 2013-02-14
Contacto: Dr. Mariano Gutiérrez **Recepción de muestras:** 2013-01-31
Muestras Tomadas Por: Adriana Gómez (Cliente) **Fecha de Muestreo:** 2013-01-30
Nombre del Proyecto: NP
Sitio de Muestreo: NP

ABREVIACIONES UTILIZADAS EN ESTE REPORTE

- LC = Limite de cuantificación.
- LCE = Limite de Cuantificación Estimado.
- LR = Limite Reportable
- NA = No Aplica
- ND = No Detectado al nivel del LC o al LCE reportado.
- NR = No Referenciado
- NC = No Calculable.
- NP = No Proporcionado.
- IM = Interferencia de Matriz.
- @ = Identificación tentativa por Interferencia de Matriz
- % de Sólidos = El resultado se expresa con base a la masa de la muestra total.
- HC = Hidrocarburos
- ♦ = Prueba subcontratada.
- Ω = No acreditado.
- ▲ = Prueba contratada.
- + = En proceso de acreditación.



La Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002 establece como separador decimal la coma (,).

Se anexa cadena de custodia original, en caso contrario la cadena traerá un comentario.

Para cualquier duda sobre su reporte favor de contactarnos a nuestras oficinas en México; estamos a sus órdenes.

Agradecemos a usted por haber considerado a Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V., como su Laboratorio de Análisis, y quedamos a sus órdenes para cualquier servicio analítico ambiental que usted y su empresa necesiten.

Atentamente

 Karina Texpan Oscoy
 Supervisor
 Signatario / Cargo

Sergio Morales
 Supervisor

Aprobación: No. CNA-GCA-749; MEX/QRO/REDLANo.33/AAR/AEA/MER/2012-2013
PADLA/DF/036/AGC/AAR/2012; PFPA-APR-LP-RE-006-09

Acreditamiento: EMA No.A-187-008/11 Vigente a partir del 19 de Mayo de 2011, R-0044-003/11 Vigente a partir del 23 de Mayo de 2011, FF-0043-002/11 Vigente a partir del 23 de Mayo de 2011, AG-180-051/11 Vigente a partir del 18 de Mayo de 2011.

Alcance: ver página www.ema.org.mx

Estos acreditamientos sólo aplican para métodos listados en los mismos. No garantiza que todo lo que se encuentra contenido en este reporte esté acreditado.

Queda prohibida la reproducción total o parcial de este documento, así como cualquier modificación o alteración en ninguna de sus partes sin la autorización previa de Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V. En caso contrario Intertek se reserva el derecho de proceder de forma legal en contra de quien(es) resulten responsable(s).
Los resultados que aparecen en este reporte pertenecen únicamente a la(s) muestra(s) analizada(s).

Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V.

Poniente 134 No. 660, Col. Industrial Vallejo
C.P. 02300, Del. Azcapotzalco, México, D.F. Tel.: 50912150
www.intertek.com

1 de 3

ILT-A002/CLS-10-F3

2da Edición Enero 2001, 7a Revisión Septiembre 03, 2010



Reporte de Resultados

Fecha de recepción de muestras: 2013-01-31

Reporte No.: 2013-MEXC-000209
Fecha de Reporte : 2013-02-14

Análisis: Hidrocarburos Fracción Media
 Nombre del Proyecto: NP
 Sitio de muestreo: NP
 Muestras Tomadas por : Adriana Gómez (Cliente)
 Cliente: Universidad Autónoma Metropolitana
 Dirección: San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, México, D.F.
 Atención a: Dr. Mariano Gutiérrez
 Matriz de la muestra: Suelo
 Método de Preparación y Análisis: EPA 3550 / EPA 8015D-2003
 Preparado / Analizado por: MRS / RGL
 Fecha de preparación: 2013-02-01
 Lote de Control de Calidad: EXT2013-3p16

Límite Máximo Permissible NOM-138-SEMARNAT/SS-2003		
Uso de Suelo (mg/kg Base Seca)		
Agrícola	Residencial	Industrial
1200,0	1200,0	5000,0

Unidades: mg/kg

Identificación Cliente	Identificación ITS	Fecha de Muestreo	Fecha de Análisis	Dilución del Método	Dilución Requerida	LC		Resultado		% Sólidos
						BH	BS	BH	BS	
Parcela 1	2013-MEXC-000209-01	2013-01-30	2013-02-01	0,067	1,0	33,33	36,11	256,80	278,22	92,3
Parcela 2	2013-MEXC-000209-02	2013-01-30	2013-02-01	0,067	1,0	33,33	36,31	254,50	277,23	91,8
Parcela 3	2013-MEXC-000209-03	2013-01-30	2013-02-01	0,067	1,0	33,33	36,71	294,70	324,56	90,8
Parcela 4	2013-MEXC-000209-04	2013-01-30	2013-02-01	0,067	1,0	33,33	36,51	242,50	265,61	91,3

BH= Base Humeda

BS= Base Seca

Queda prohibida la reproducción total o parcial de este documento, así como cualquier modificación o alteración en ninguna de sus partes sin la autorización previa de Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V. En caso contrario Intertek se reserva el derecho de proceder de forma legal en contra de quien(es) resulten responsable(s).
 Los resultados que aparecen en este reporte pertenecen únicamente a la(s) muestra(s) analizada(s).

Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V.

Poniente 134 No. 660, Col. Industrial Vallejo
 C.P. 02300, Del. Azcapotzalco, México, D.F. Tel.: 50912150
www.intertek.com





Reporte de Resultados

Fecha de recepción de muestras: 2013-01-31

Reporte No.: 2013-MEXC-000209
Fecha de Reporte : 2013-02-14

Análisis: Hidrocarburos Fracción Pesada
Nombre del Proyecto: NP
Sitio de muestreo: NP
Muestras Tomadas por: Adriana Gómez (Cliente)
Cliente: Universidad Autónoma Metropolitana
Dirección: San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, México, D.F.
Atención a: Dr. Mariano Gutiérrez
Matriz de la muestra: Suelo
Método de Preparación y Análisis: EPA 9071B / EPA 1664A
Preparado / Analizado por: MMF,IPH
Fecha de preparación: 2013-02-06
Lote de Control de Calidad: QHU2013-7p2

Límite Máximo Permissible NOM-138-SEMARNAT/SS-2003		
Uso de Suelo (mg/kg Base Seca)		
Agrícola	Residencial	Industrial
3000,0	3000,0	6000,0

Unidades: mg/kg

Identificación Cliente	Identificación ITS	Fecha de Muestreo	Fecha de Análisis	Dilución del Método	Dilución Requerida	LC		Resultado		% Sólidos
						BH	BS	BH	BS	
Parcela 1	2013-MEXC-000209-01	2013-01-30	2013-02-06	1,0	1,0	266,00	288,19	900,00	975,08	92,3
Parcela 2	2013-MEXC-000209-02	2013-01-30	2013-02-06	1,0	1,0	266,00	289,76	1000,00	1089,32	91,8
Parcela 3	2013-MEXC-000209-03	2013-01-30	2013-02-06	1,0	1,0	266,00	292,95	930,00	1024,23	90,8
Parcela 4	2013-MEXC-000209-04	2013-01-30	2013-02-06	1,0	1,0	266,00	291,35	890,00	974,81	91,3

FIN DEL REPORTE

BH= Base Humeda

BS= Base Seca

Queda prohibida la reproducción total o parcial de este documento, así como cualquier modificación o alteración en ninguna de sus partes sin la autorización previa de Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V. En caso contrario Intertek se reserva el derecho de proceder de forma legal en contra de quien(es) resulten responsable(s).
 Los resultados que aparecen en este reporte pertenecen únicamente a la(s) muestra(s) analizada(s).

Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V.

Poniente 134 No. 660, Col. Industrial Vallejo
 C. P. 02300, Del. Azcapotzalco, México, D.F. Tel.: 50912150
www.intertek.com





**RESULTADOS DE MUESTRAS ANALIZADAS POR
INTERTEK TESTING SERVICES
LABORATORIOS AMBIENTALES
MÉXICO**

REPORTE ELABORADO PARA: UAM-I
San Rafael Atlixco 186

ATENCIÓN: Adriana Gómez

FECHA DE MUESTREO: 2011-02-09

Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V.
Poniente 134 No. 660, Col. Industrial Vallejo
C.P. 02300, Del. Azcapotzalco, México, D.F. Tel.: 50912150
www.intertek.com

2da Edición Enero 2001, 7a Revisión Septiembre 03, 2010

IT-020-031-10P2



REPORTE DE RESULTADOS

Empresa:	UAM-I	No. de Orden de Trabajo:	MX11-0222
Dirección:	San Rafael Atlixco 186	Fecha de Reporte:	2011-03-11
Contacto:	Adriana Gómez	Recepción de muestras:	2011-02-09
Muestras Tomadas Por:	Adriana Gómez	Fecha de Muestreo:	2011-02-09
Nombre del Proyecto:	Parcela UAM		
Sitio de Muestreo:	UAM Iztapalapa		

ABREVIACIONES UTILIZADAS EN ESTE REPORTE

- LC = Limite de cuantificación.
- LCE = Limite de Cuantificación Estimado.
- LR = Limite Reportable
- NA = No Aplica
- ND = No Detectado al nivel del LC o al LCE reportado.
- NR = No Referenciado
- NC = No Calculable.
- NP = No Proporcionado.
- IM = Interferencia de Matriz.
- @ = Identificación tentativa por Interferencia de Matriz
- % de Sólidos = El resultado se expresa con base a la masa de la muestra total.
- HC = Hidrocarburos
- ♦ = Prueba subcontratada.
- Ω = No acreditado.
- ▲ = Prueba contratada.
- & = Analisis realizado en Sucursal ITS-Azcapotzalco. R-0171-017/10. Vigencia a partir 2010-04-23.
- + = Alcance: ver www.ema.org.mx
- + = En proceso de acreditación.

La Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002 establece como separador decimal la coma (,).

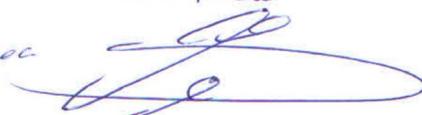
Se anexa cadena de custodia original, en caso contrario la cadena traerá un comentario.

Para cualquier duda sobre su reporte favor de contactarnos a nuestras oficinas en México; estamos a sus órdenes.

Agradecemos a usted por haber considerado a Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V., como su Laboratorio de Análisis, y quedamos a sus órdenes para cualquier servicio analítico ambiental que usted y su empresa necesiten.

Atentamente

 Signatario / Cargo *coord. de area*

LUIS E. JARNEZ FUENTES
 ANALISTA QUIMICO


Aprobación: No. CNA-GSCA-537
 Aprobación: DF/MEX/QRO/REDLA033/AAR/AEA/MER/2010
 Acreditamiento: EMA No. A-187-008/07, R-0044-003/07, FF-0043-002/07, AG-188-051/07 Vigencia 2007-05-16 a 2011-05-16
 Alcance: ver página www.ema.org.mx
 Estos acreditamientos sólo aplican para métodos listados en los mismos. No garantiza que todo lo que se encuentra contenido en este reporte esté acreditado.

Queda prohibida la reproducción total o parcial de este documento, así como cualquier modificación o alteración en ninguna de sus partes sin la autorización previa de Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V. En caso contrario Intertek se reserva el derecho de proceder de forma legal en contra de quien(es) resulten responsable(s).
 Los resultados que aparecen en este reporte pertenecen únicamente a la(s) muestra(s) analizada(s).

Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V.
 Poniente 134 No. 660, Col. Industrial Vallejo
 C.P. 02300, Del. Azcapotzalco, México, D.F. Tel.: 50912150
www.intertek.com

2da Edición Enero 2001, 7a Revisión Septiembre 03, 2010

1 de 6
ILT-A002/CL5 10 F3



Reporte de Resultados

Fecha de recepción de muestras: 2011-02-09

Reporte No.: MX11-0222
Fecha de Reporte : 2011-03-11

Análisis: Hidrocarburos Fracción Pesada
Nombre del Proyecto: Parcela UAM
Sitio de muestreo: UAM Iztapalapa
Muestras Tomadas por : Adriana Gómez
Cliente: UAM-I
Dirección: San Rafael Atlixco 186
Atención a: Adriana Gómez
Matriz de la muestra: Suelo
Método de Preparación y Análisis: EPA 9071B / EPA 1664A
Preparado / Analizado por: JLHS,HMG
Fecha de preparación: 2011-02-11
Lote de Control de Calidad: QHU2011-4p25

Límite Máximo Permisible			NOM-138-SEMARNAT/SS-2003		
Uso de Suelo (mg/kg			Base Seca)		
Agrícola	Residencial	Industrial			
3000,0	3000,0	6000,0			

Unidades: mg/kg

Identificación Cliente	Identificación ITS	Fecha de Muestreo	Fecha de Análisis	Dilución del Método	Dilución Requerida	LC		Resultado		% Sólidos
						BH	BS	BH	BS	
UAM-1	MX11-0222-01	2011-02-09	2011-02-11 al 14	1,0	1,0	311,50	334,59	860,00	923,74	93,1
UAM-2	MX11-0222-02	2011-02-09		1,0	1,0	311,50	342,31	1220,00	1340,66	91,0
UAM-3	MX11-0222-03	2011-02-09		1,0	1,0	311,50	347,27	1070,00	1192,87	89,7
UAM-4A	MX11-0222-04	2011-02-09		1,0	1,0	311,50	339,69	1170,00	1275,90	91,7

BH= Base Humeda

BS= Base Seca

Queda prohibida la reproducción total o parcial de este documento, así como cualquier modificación o alteración en ninguna de sus partes sin la autorización previa de Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V. En caso contrario Intertek se reserva el derecho de proceder de forma legal en contra de quien(es) resulten responsable(s).
 Los resultados que aparecen en este reporte pertenecen únicamente a la(s) muestra(s) analizada(s).

Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V.

Poniente 134 No. 660, Col. Industrial Vallejo
 C.P. 02300, Del. Azcapotzalco, México, D.F. Tel.: 50912150
www.intertek.com





Reporte de Resultados

Fecha de recepción de muestras: 2011-02-09

Reporte No.: MX11-0222
Fecha de Reporte : 2011-03-11

Análisis: Hidrocarburos Fracción Media
Nombre del Proyecto: Parcela UAM
Sitio de muestreo: UAM Iztapalapa
Muestras Tomadas por : Adriana Gómez
Cliente: UAM-I
Dirección: San Rafael Atlixco 186
Atención a: Adriana Gómez
Matriz de la muestra: Suelo
Método de Preparación y Análisis: EPA 3550 / EPA 8015
Preparado / Analizado por: PRE / LACG
Fecha de preparación: 2011-02-10
Lote de Control de Calidad: EXT2010-47p271

Límite Máximo Permisible			NOM-138-SEMARNAT/SS-2003		
Uso de Suelo (mg/kg Base Seca)					
Agrícola	Residencial	Industrial	Agrícola	Residencial	Industrial
1200,0	1200,0	5000,0	1200,0	1200,0	5000,0

Unidades: mg/kg

Identificación Cliente	Identificación ITS	Fecha de Muestreo	Fecha de Análisis	Dilución del Método	Dilución Requerida	LCE		Resultado		% Sólidos
						BH	BS	BH	BS	
UAM-1	MX11-0222-01	2011-02-09	2011-02-16	0,1333	2,0	37,30	40,06	279,10	299,79	93,1
UAM-2	MX11-0222-02	2011-02-09	2011-02-16	0,1333	2,0	37,30	40,99	394,00	432,97	91,0
UAM-3	MX11-0222-03	2011-02-09	2011-02-16	0,1333	2,5	46,70	52,06	398,30	444,04	89,7
UAM-4A	MX11-0222-04	2011-02-09	2011-02-16	0,1333	2,5	46,70	50,93	447,90	488,44	91,7

BH= Base Humeda

BS= Base Seca

Queda prohibida la reproducción total o parcial de este documento, así como cualquier modificación o alteración en ninguna de sus partes sin la autorización previa de Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V. En caso contrario Intertek se reserva el derecho de proceder de forma legal en contra de quien(es) resulten responsable(s).
 Los resultados que aparecen en este reporte pertenecen únicamente a la(s) muestra(s) analizada(s).

Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V.

Poniente 134 No. 660, Col. Industrial Vallejo
 C.P. 02300, Del. Azcapotzalco, México, D.F. Tel.: 50912150
www.intertek.com



2da Edición Enero 2001, 7a Revisión Septiembre 03, 2010

ILT-A/002/CL5.10-F3

3 de 6

Reporte de Resultados

Fecha de recepción de muestras: 2011-02-09

Reporte No.: MX11-0222
Fecha de Reporte : 2011-03-11

Análisis: Hidrocarburos Fracción Ligera
Nombre del Proyecto: Parcela UAM
Sitio de muestreo: UAM Iztapalapa
Muestras Tomadas por : Adriana Gómez
Ciente: UAM-I
Dirección: San Rafael Atlixco 186
Atención a: Adriana Gómez
Matriz de la muestra: Suelo
Método de Preparación y Análisis: EPA 5030 / EPA 8015
Preparado / Analizado por: ELGM, ONF / LEYF
Fecha de preparación: 2011-02-15
Lote de Control de Calidad: VOL2010-19p84

Límite Máximo Permissible		NOM-138-SEMARNAT/SS-2003	
Uso de Suelo (mg/kg Base Seca)			
Agrícola	Residencial	Industrial	
200,0	200,0	500,0	

Unidades: mg/kg

Identificación Cliente	Identificación ITS	Fecha de Muestreo	Fecha de Análisis	Dilución del Método	Dilución Requerida	LC		Resultado		% Sólidos
						BH	BS	BH	BS	
UAM-4 B	MX11-0222-05	2011-02-09	2011-02-18	250,0	1,0	9,38	11,31	< 9,38	< 11,31	82,9

BH= Base Humeda

BS= Base Seca

Queda prohibida la reproducción total o parcial de este documento, así como cualquier modificación o alteración en ninguna de sus partes sin la autorización previa de Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V. En caso contrario Intertek se reserva el derecho de proceder de forma legal en contra de quien(es) resulten responsable(s).
 Los resultados que aparecen en este reporte pertenecen únicamente a la(s) muestra(s) analizada(s).

Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V.

Poniente 134 No. 660, Col. Industrial Vallejo
 C.P. 02300, Del. Azcapotzalco, México, D.F. Tel: 50912150
www.intertek.com





Reporte de Resultados

Fecha de recepción de muestras: 2011-02-09

Reporte No.: MX11-0222
Fecha de Reporte : 2011-03-11

Análisis: BTEX
Nombre del Proyecto: Parcela UAM
Sitio de muestreo: UAM Iztapalapa
Muestras Tomadas por : Adriana Gómez
Cliente: UAM-I
Dirección: San Rafael Atlixco 186
Atención a: Adriana Gómez
Matriz de la muestra: Suelo
Método de Preparación / Análisis : EPA 5030 / EPA 8260
Preparado / Analizado por: ONF / JVD,ELGM
Fecha de Preparación: 2011-02-15
Lote de Control de Calidad: VOL2011-5p16

Parámetro	Límite Máximo Permissible Uso de Suelo (mg/kg Base Seca)		
	Agrícola	Residencial	Industrial
Benceno	6,0	6,0	15,0
Tolueno	40,0	40,0	100,0
Etilbenceno	10,0	10,0	25,0
Xilenos (suma)	40,0	40,0	100,0

Unidades: mg/kg

Identificación Cliente	Identificación ITS	Fecha de Muestreo	Parámetros	Fecha de Análisis	Dilución Requerida	Dilución del Método	LC / LCE*		Resultado		% Sólidos
							BH	BS	BH	BS	
UAM-4 B	MX11-0222-05	2011-02-09	Benceno	2011-03-01	1,0	125,0	0,625	0,754	< 0,625	< 0,754	82,9
UAM-4 B	MX11-0222-05	2011-02-09	Etilbenceno	2011-03-01	1,0	125,0	0,625	0,754	< 0,625	< 0,754	82,9
UAM-4 B	MX11-0222-05	2011-02-09	Tolueno	2011-03-01	1,0	125,0	0,625	0,754	< 0,625	< 0,754	82,9
UAM-4 B	MX11-0222-05	2011-02-09	m,p-Xileno	2011-03-01	1,0	125,0	1,250	1,508	< 1,250	< 1,508	82,9
UAM-4 B	MX11-0222-05	2011-02-09	o-Xileno	2011-03-01	1,0	125,0	0,625	0,754	< 0,625	< 0,754	82,9
UAM-4 B	MX11-0222-05	2011-02-09	Total de BTEX	2011-03-01	NA	NA	NA	NA	ND	ND	82,9

Concentración mínima encontrada.

Queda prohibida la reproducción total o parcial de este documento, así como cualquier modificación o alteración en ninguna de sus partes sin la autorización previa de Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V. En caso contrario Intertek se reserva el derecho de proceder de forma legal en contra de quien(es) resulten responsable(s).
 Los resultados que aparecen en este reporte pertenecen únicamente a la(s) muestra(s) analizada(s).



Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V.

Poniente 134 No. 660, Col. Industrial Vallejo
 C.P. 02300, Del. Azcapotzalco, México, D.F. Tel : 50912150
www.intertek.com

5 de 6

2da Edición Enero 2001. 7a Revisión Septiembre 03, 2010

ILT-A002/CI.5.10-F3



Reporte de Resultados

Fecha de recepción de muestras: 2011-02-09

Reporte No.: MX11-0222
Fecha de Reporte : 2011-03-11

Análisis: & PAH's
Nombre del Proyecto: Parcela UAM
Sitio de muestreo: UAM Iztapalapa
Muestras Tomadas por : Adriana Gómez
Cliente : UAM-I
Dirección: San Rafael Atlixco 186
Atención a: Adriana Gómez
Matriz de la muestra: Suelo
Método de Preparación / Análisis : EPA 3550 / EPA 8270
Preparado / Analizado por: PRE,CEC / GSN
Fecha de Preparación: 2011-02-10
Lote de Control de Calidad: REF12010-4p78

Párametro	Límite Máximo Permissible Uso de Suelo (mg/kg Base Seca)		
	Agrícola	Residencial	Industrial
Benzo (a) antraceno	2,0	2,0	10,0
Benzo (a) pireno	2,0	2,0	10,0
Benzo (b) Fluoranteno	2,0	2,0	10,0
Benzo (k) Fluoranteno	8,0	8,0	80,0
Dibenzo (a,h) antraceno	2,0	2,0	10,0
Indeno (1,2,3-cd) pireno	2,0	2,0	10,0

Unidades: mg/kg

Identificación Cliente	Identificación ITS	Fecha de Muestreo	Parámetros	Fecha de Análisis	Dilución Requerida	Dilución del Método	LC		Resultado		% Sólidos
							B.H.	B.S.	B.H.	B.S.	
UAM-1	MX11-0222-01	2011-02-09	Benzo (a) antraceno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,430	< 0,400	< 0,430	93,1
UAM-1	MX11-0222-01	2011-02-09	Benzo (a) pireno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,430	< 0,400	< 0,430	93,1
UAM-1	MX11-0222-01	2011-02-09	Benzo (b) Fluoranteno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,430	< 0,400	< 0,430	93,1
UAM-1	MX11-0222-01	2011-02-09	Benzo (k) Fluoranteno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,430	< 0,400	< 0,430	93,1
UAM-1	MX11-0222-01	2011-02-09	Dibenzo (a,h) antraceno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,430	< 0,400	< 0,430	93,1
UAM-1	MX11-0222-01	2011-02-09	Indeno (1,2,3-cd) pireno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,430	< 0,400	< 0,430	93,1
UAM-2	MX11-0222-02	2011-02-09	Benzo (a) antraceno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,440	< 0,400	< 0,440	91,0
UAM-2	MX11-0222-02	2011-02-09	Benzo (a) pireno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,440	< 0,400	< 0,440	91,0
UAM-2	MX11-0222-02	2011-02-09	Benzo (b) Fluoranteno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,440	< 0,400	< 0,440	91,0
UAM-2	MX11-0222-02	2011-02-09	Benzo (k) Fluoranteno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,440	< 0,400	< 0,440	91,0
UAM-2	MX11-0222-02	2011-02-09	Dibenzo (a,h) antraceno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,440	< 0,400	< 0,440	91,0
UAM-2	MX11-0222-02	2011-02-09	Indeno (1,2,3-cd) pireno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,440	< 0,400	< 0,440	91,0
UAM-3	MX11-0222-03	2011-02-09	Benzo (a) antraceno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,446	< 0,400	< 0,446	89,7
UAM-3	MX11-0222-03	2011-02-09	Benzo (a) pireno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,446	< 0,400	< 0,446	89,7
UAM-3	MX11-0222-03	2011-02-09	Benzo (b) Fluoranteno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,446	< 0,400	< 0,446	89,7
UAM-3	MX11-0222-03	2011-02-09	Benzo (k) Fluoranteno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,446	< 0,400	< 0,446	89,7
UAM-3	MX11-0222-03	2011-02-09	Dibenzo (a,h) antraceno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,446	< 0,400	< 0,446	89,7
UAM-3	MX11-0222-03	2011-02-09	Indeno (1,2,3-cd) pireno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,446	< 0,400	< 0,446	89,7
UAM-4A	MX11-0222-04	2011-02-09	Benzo (a) antraceno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,436	< 0,400	< 0,436	91,7
UAM-4A	MX11-0222-04	2011-02-09	Benzo (a) pireno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,436	< 0,400	< 0,436	91,7
UAM-4A	MX11-0222-04	2011-02-09	Benzo (b) Fluoranteno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,436	< 0,400	< 0,436	91,7
UAM-4A	MX11-0222-04	2011-02-09	Benzo (k) Fluoranteno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,436	< 0,400	< 0,436	91,7
UAM-4A	MX11-0222-04	2011-02-09	Dibenzo (a,h) antraceno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,436	< 0,400	< 0,436	91,7
UAM-4A	MX11-0222-04	2011-02-09	Indeno (1,2,3-cd) pireno	2011-02-22	1,0	133,30	0,400	0,436	< 0,400	< 0,436	91,7

BH= Base Humeda

BS= Base Seca

Queda prohibida la reproducción total o parcial de este documento, así como cualquier modificación o alteración en ninguna de sus partes sin la autorización previa de Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V. En caso contrario Intertek se reserva el derecho de proceder de forma legal en contra de quien(es) resulten responsable(s).
Los resultados que aparecen en este reporte pertenecen únicamente a la(s) muestra(s) analizada(s).

FIN DEL REPORTE

Intertek Testing Services de México, S.A. de C.V.

Posterior 134 No. 660, Col. Industrial Vallejo
C.P. 02300, Del. Azcapotzalco, México, D.F. Tel.: 50912150
www.intertek.com

© de S



APÉNDICE III

Plant Soil (2013) 362:261–270
DOI 10.1007/s11104-012-1292-6

REGULAR ARTICLE

Inoculation of seed-borne fungus in the rhizosphere of *Festuca arundinacea* promotes hydrocarbon removal and pyrene accumulation in roots

A. Cruz-Hernández · A. Tomasini-Campocoso ·
L. J. Pérez-Flores · F. J. Fernández-Perrino ·
M. Gutiérrez-Rojas

Received: 3 February 2012 / Accepted: 27 March 2012 / Published online: 22 May 2012
© Springer Science+Business Media B.V. 2012

Abstract

Background and aims The selective inoculation of specific hydrocarbon-degrading microbes into the plant rhizosphere offers a useful means for remediating hydrocarbon-contaminated soils. The effect of inoculating a seed-borne filamentous fungus (*Lewia* sp.) on hydrocarbon removal by *Festuca arundinacea* and its growth was studied on perlite (model soil) and soil, both spiked with hydrocarbons.

Methods A hydrocarbon mixture (1,500 mg kg⁻¹) of two polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), phenanthrene and pyrene, blended with hexadecane (1.0:0.5:0.5 weight) was used. Greenhouse experiments were carried out for 45 days. Inoculated and non-inoculated plants were grown in dark cylindrical glass pots containing perlite or soil.

Results Inoculation with *Lewia* sp. stimulated (100 %) root growth in spiked perlite. Inoculated plants

showed higher phenanthrene removal (100 %) compared to non-inoculated plants in perlite and soil. Pyrene removal by inoculated plants was 37-fold higher than that by non-inoculated plants in perlite; in soil, pyrene removal by inoculated plants (97.9 %) differed significantly from that of non-inoculated plants (91.4 %). Accumulation of pyrene in roots (530.9 mg kg⁻¹ of dry roots) was promoted in perlite. **Conclusions** Our results demonstrate that *Lewia* sp. (endophytic fungus) improved the efficiency of PAH removal by *Festuca arundinacea* and stimulated pyrene accumulation in roots.

Keywords Seed-borne filamentous fungus · Endophytic fungus · *Lewia* sp. · PAH · *Festuca arundinacea*

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) composed of two or more condensed aromatic rings of carbon and hydrogen atoms, are chemically stable at room temperature, and due to their hydrophobic structures, are almost or totally insoluble in water and are highly lipophilic (Gan et al. 2009). PAH are found in the environment, soil included, as a result of the incomplete combustion of organic matter, motor vehicle, stationary matter (e.g. coal-fired, electricity generating power plants), domestic matter (e.g. tobacco smoke and residential wood or coal combustion), area source

Responsible Editor: Bernard Glick.

A. Cruz-Hernández · A. Tomasini-Campocoso ·
F. J. Fernández-Perrino · M. Gutiérrez-Rojas (✉)
Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma
Metropolitana-Iztapalapa,
Av. San Rafael Atlixco No. 186. Col. Vicentina,
Iztapalapa, Mexico, D. F. C.P. 09340, Mexico
e-mail: mgr@xanum.uam.mx

L. J. Pérez-Flores
Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad
Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,
Av. San Rafael Atlixco No. 186. Col. Vicentina,
Iztapalapa, Mexico, D. F. C.P. 09340, Mexico

matter (e.g. forest fires and agricultural burning), waste incinerator, oil refining, asphalt production, and aluminium production (Sudip et al. 2002; Srogi 2007). Some PAH have been found to be carcinogenic, cytotoxic, or ecotoxic (Srogi 2007) and are persistent organic pollutants. Soils contaminated with PAH pose potential risks to human and ecological health (Sudip et al. 2002). Recently, interest in developing *in situ* remediation strategies for environmental contaminants with PAH has increased (Gan et al. 2009; Ndimele 2010). A variety of plants, including the grass family, have been considered for contaminated soil phytoremediation purposes and are an economic and effective technology for abating contaminants in soil (Chiapusio et al. 2007). Phytoremediation involves the use of plants and their associated microbes for environmental clean-up (Pilon-Smits 2005). There are three possible mechanisms for the phytoremediation of organic pollutants: (1) phytovolatilization, the evaporation of absorbed volatile compounds through plant leaves, (2) phytodegradation, the accumulation and subsequent metabolism of contaminants by plants after uptake by roots, (3) phytostimulation or rhizodegradation, the degradation or transformation of contaminants in soil by the microbial community induced by root exudates (Pilon-Smits 2005; Lazcano et al. 2010). A variety of rhizosphere microorganisms have been investigated for the degradation of petroleum hydrocarbons. Many bacteria have been discovered that degrade PAH and diverse fungi capable of utilizing PAH have been also investigated. For example, Cerniglia and Sutherland (2010) reported fungi able to metabolize PAH with enzymes that include peroxidase, laccase and hydrolase. Current phytoremediation research suggests that endophytic fungi will play an increasingly important role (Scharl et al. 2004; Mohsenzadeh et al. 2010). Endophytes are defined as microbes that colonize the living internal tissues of a plant without causing any immediate and obvious negative effect (Tarkka et al. 2008). These fungi benefit from the association through the provision of nutrients by root exudates, whereas the plants benefit through enhanced nutrient uptake and the reduced toxicity of soil contaminants (Chaudhry et al. 2005). Further developments in this area are expected to focus on ways of providing conditions that promote plant growth

in the soil, and accelerate the remediation of hydrocarbon-contaminated soil through selective inoculation with specific hydrocarbon-degrading microbes in the plant rhizosphere. This study was conducted to evaluate the effect of *Lewia* sp. (a seed-borne filamentous fungus) as an inoculum on hydrocarbon removal and accumulation by *Festuca arundinacea*. Since soil is a complex system made up of a heterogeneous mixture of solid, liquid, and gaseous components, matrices such as perlite and peat moss (Escalante-Espinosa et al. 2005) or glass beads (Acevedo et al. 2011) have been used in addition to soil in order to understand the role of rhizosphere microorganisms. In this work, perlite and soil spiked with hydrocarbons were used.

Materials and methods

Plant material

Seeds of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) were obtained from a wholesale food market in Mexico City and kept at room temperature. The seeds were surface-sterilized. Damaged and small seeds were removed by hand and selected seeds were placed into a filter paper envelope, submerged into a commercial powder soap solution (60 g soap L⁻¹ water) for 20 min with constant agitation, and rinsed with tap water for 10 min. The envelope containing the seeds was then submerged in 70 % (v/v) ethanol for 30 s in a laminar flow hood, followed by immersion in 10 % (v/v) sodium hypochlorite containing 0.1 mL of Tween-20 for 25 min, and finally in 70 % (v/v) ethanol for 1 min with constant agitation. The envelope was washed three times with 100 mL of deionized sterile water. The envelope was opened under aseptic conditions and surface-sterilized seeds (disinfested) were stored in sterile empty Petri dishes for subsequent use.

Fungus

Isolation and preparation of inoculant

The fungal strain used was isolated from surface-sterilized commercial seeds of *F. arundinacea*. This fungus was propagated on Petri dishes containing potato dextrose agar (30°C, 10 days) and maintained at 4°C. Several fungal disks (5 mm) were aseptically

punched out from the Petri dishes. Individual disks were transferred to Petri dishes and Erlenmeyer flasks containing 25 and 50 mL of medium, respectively. The medium used for plant aseptic cultures was also used for fungal culture, and comprised 4.4 g L⁻¹ Murashige and Skoog (MS), including micro- and macro-nutrient stock solutions (Murashige and Skoog 1962) and 30 g L⁻¹ sucrose. pH was adjusted with 0.1 N NaOH to 5.8 and the mixture was autoclaved (15 min at 1.2 kg cm⁻²). Two g L⁻¹ of Phytigel (agar substitute, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) was added to the medium destined for Petri dishes. After incubation (14 days, 30°C), one fungal disk was used as inoculum in phytopathogenic assays.

Finally, the pellets that formed in the Erlenmeyer flasks after 10 days incubation at 200 rpm, 30°C, were disrupted with glass beads to achieve a homogeneous cell suspension. The cell suspensions were mixed in equal volumes with an isotonic solution and used as the inoculum for hydrocarbon removal experiments.

Molecular identification

The isolated fungus was grown in liquid medium (50 mL): sucrose, 40; NaNO₃, 3; yeast extract, 2; KCl, 0.5; MgSO₄·7H₂O, 0.5; FeSO₄·7H₂O, 0.1 (g L⁻¹) at 30°C, 200 rpm for 48 h. Fresh mycelium was collected and disrupted with liquid nitrogen. Fungal DNA was extracted using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. PCR amplification was carried out using ITS5 and ITS4b primers for 30 cycles of 94°C for 45 s; 55°C for 1 min; and 72°C for 45 s. ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4b (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') are primers for conserved sequences of fungal 18S rDNA and 28S rDNA, respectively (Gardes and Bruns 1993; Larena et al. 1999). The amplified product thus included a partial sequence of the 18S rDNA gene, the internal transcribed spacer 1 (ITS1), the complete 5.8S rDNA gene, the internal transcribed spacer 2 (ITS2), and a partial sequence of the 28S rDNA gene. The PCR reaction was separated on a 1.5 % (w/v) agarose gel and the expected product of 600–650 base pairs was excised from the gel and purified using a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). The nucleotide sequence of the product was determined using AmpliTaq DNA Polymerase

FS and the ABIPrism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit on an ABIPRISM 3100 system (Applied Biosystems). The nucleotide sequence of the amplified product was analysed using the BLAST (NCBI) programme (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Model soil

Perlite (Dicalite, México) was used to simulate soil. Perlite is an amorphous volcanic glass that is used as a soil amendment or as a hydroponics medium. The perlite was sieved through 4.76-mm and 1.19-mm meshes. The remaining fraction was washed with hot tap water, air-dried, and stored at room temperature for further use.

Soil sample

A non-contaminated soil sample (250 kg) was obtained from Hueypoxtla, in Mexico State (19°54' 10.6"N, 99°05'16.0"W). The soil sample was collected from a depth of 0 to 20 cm, transported to our laboratory and immediately air-dried and passed through a 2 mm sieve to remove stones and roots. The original particle size distribution (54.8 % sand, 25.2 % silt, and 24.6 % clay) allowed us to identify the soil sample as a sandy-clay-loam soil. The organic matter content was 4.2 % and the pH was 7.53.

Hydrocarbons

Hexadecane (HXD), phenanthrene (PHE) (purity >96 %), and pyrene (PYR) (purity >98 %) were purchased from Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Germany). The substances were dissolved in acetone (Mallinckrodt Baker, Edo. Mex., Mexico). The blend ratio of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) was: PHE and PYR (1:1; w/w). HXD and the PAH blend (1:1; w/w) were combined to form the hydrocarbon mixture (HM).

Artificially spiked soil and model soil

Perlite and soil were artificially contaminated with acetone-dissolved HM up to a concentration of 1,500 mg kg⁻¹. Excess acetone was air-evaporated off; the spiked soils were placed in dark plastic bags and stored at room temperature for 6 weeks. The initial

concentrations of HXD, PHE and PYR in the treated soils were measured before transfer to experimental pots. Control soil, without HM, was treated in the same way.

Seed germination and phytopathogenic assays

These experiments were performed under aseptic conditions. MS medium (10 mL), 10 g L⁻¹ sucrose and 2 g L⁻¹ Phytagel (agar substitute, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) were added to culture tubes (diameter 2.5 cm, height 15 cm), prior to sterilizing for 15 min at 1.2 kg cm⁻². One disinfested seed was aseptically placed into each culture tube. The culture tube was closed with a plastic cap and sealed with Parafilm. Sealed culture tubes were kept at 25±2°C, with a 16-h photoperiod. All seeds were cultivated during 20 days and then fungus-free seedlings were inoculated with the isolated fungus, under aseptic conditions; one fungal disk (5 mm) was placed into each culture tube with one seedling. After 60 days, the phytopathogenic response was evaluated as positive or negative. It was negative when inoculated plants were green and healthy. Fungal growth within the roots tissues was evaluated. The plants were harvested, separated into roots and shoots, and the roots were surface-sterilized to eliminate remaining fungal coloniser from the root surface. Under a laminar flow hood, roots were submerged into 70 % ethanol for 30 s, 10 % sodium hypochlorite for 10 min, 70 % ethanol for 30 s, and washed with sterile water. The surface-sterilized roots were cut with sterile scalpel (5 mm length) and cultivated on Petri dishes containing potato dextrose agar (30°C, 10 days). Hyphae colonisation was periodically observed using visual methods with Zoom Stereo Microscope (Olympus SZ61).

Hydrocarbon removal

The effect of the filamentous fungus on hydrocarbon degradation by *F. arundinacea* was evaluated in dark cylindrical glass pots containing spiked perlite (40 g) or soil (400 g). After 30 days of seed germination under aseptic conditions, six or three *F. arundinacea* seedlings were transplanted to each pot of perlite or soil, respectively. Four sets of treatments (three pots per treatment) were assayed simultaneously: (1) plants inoculated with the fungus, (2) non-inoculated plants,

(3) an unplanted control with only the fungus, and (4) a control without fungus or plants. Fungal inoculation (mycelium suspension; 1 mL) of planted and unplanted perlite and soil was performed after 20 days (this was considered the start of the removal process). A modified Long-Ashton solution was added as a nutrient solution twice a week (in g L⁻¹): KNO₃, 808; Ca(NO₃)₂·4H₂O, 944; NaH₂PO₄·H₂O, 184; and MgSO₄·7H₂O, 368; 1 mL of oligoelement solution was also added. The oligoelement solution comprised (in mg L⁻¹): MnSO₄·4H₂O, 2.23; CuSO₄·5H₂O, 0.25; ZnSO₄·7H₂O, 0.29; H₃BO₃, 3.10; NaCl, 5.90; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0.088; FeSO₄·7H₂O, 0.02. Pots were maintained at 23–28°C, with a 16-h photoperiod. After 45 days, the plants were harvested, separated into roots and shoots, and the roots were washed to remove perlite or soil. Root and shoot length was measured using a graduated 30-cm transparent plastic ruler. Total root and shoot dry weights were determined upon reaching a constant weight after drying at 60°C. Perlite and soil were carefully collected from each pot, air-dried and homogenized. Plant and soil samples were stored at room temperature for further analysis.

Analytical methods

Spiked soil and model soil hydrocarbon extraction

Residual hydrocarbons were extracted using a MARS-Solvent Extraction Microwave. Samples of dry perlite or soil (5 g dry weight) were mixed with 30 mL of dichloromethane:acetone (1:1) in MARS vessels. Perlite and soil samples were extracted at 175–200 psig and 150°C for 30 min. The extraction efficiencies of the method were: 87.6 %±8.4 for HXD, 96.7 %±3.2 for PHE, and 99.6 %±2.2 for PYR. The average recovery from the samples was 82.2 %±9.6 for HXD, 82.0 %±10.2 for PHE, and 84.6 %±9.5 for PYR in perlite, and 60.2 %±3.6 for HXD, 75.8 %±5.6 for PHE, and 84.8 %±2.2 for PYR in soil, 40 days after spiking.

Plant hydrocarbon extraction

The root and shoot samples were ground in liquid nitrogen using a mortar. Shoots were treated with 30 mL of KOH (1 N) in methanol: H₂O (80:20; v/v) for 30 min at 60°C in order to saponify the

chlorophylls. Saponification allows a good elimination of the interfering chlorophylls from the extracts containing the PAH (Dugay et al. 2002). The hydrocarbons were extracted with dichloromethane (DCM) (30 mL). Each sample was filtered and reduced to 10 mL by evaporation for further chromatographic analyses.

Hydrocarbon quantification

Hydrocarbons were quantified using a Varian 3900 gas chromatograph, flame ionization detector (FID), and AT-1HT (15 m, 0.25 mm i.d. \times 0.10 μ m film thickness) column; helium was the carrier gas, and the gas flow rate was 2.0 mL min⁻¹. Aliquots of 2 μ L were injected in splitless mode. Injection was performed using a Varian CP-8410 auto injector. The initial oven temperature was 100°C (hold for 2 min). Temperature was increased to 200°C at 20°C min⁻¹ with a final holding time of 1 min. The injector and transfer lines were heated to 300°C.

Statistical analysis

A completely randomized factorial design was implemented with and without fungus with three replicates. An analysis of variance (one-way ANOVA) was conducted for all treatments using the NCSS programme 2007. Statistical differences among individual treatments were assessed using the Tukey-Kramer test ($\alpha=0.05$).

Results

Molecular identification

Fungal identification was based on nucleotide sequence analysis of enzymatically amplified ITS rDNA, after comparison with deposited fungal sequences through a standard nucleotide BLAST homology search. The strain was found to be similar to the genus *Lewia* (EF432279; 100 % similarity in 555 bp). Therefore, the filamentous fungus is hereafter named *Lewia* sp. ACH-4. The nucleotide sequence was registered in the GenBank nucleotide database (accession number GU296022).

Phytopathogenic assays and plant growth

Pathogenic responses derived from *Lewia* sp. were evaluated after 60 days of culture in aseptic MS medium (Fig. 1). It should be noted that we successfully used the same plant medium (MS) to grow *Lewia* sp. *F. arundinacea* showed no pathogenic symptoms. In contrast, *Lewia* sp. had a positive effect on plant growth: healthy shoot and tiller numbers were enhanced, as shown in Fig. 1a. Figure 1c shows, morphologically changes produced by the presence of *Lewia* sp. Root thickness was higher than that of non-inoculated roots, as shown in Fig. 1d. In addition, Fig. 2 shows a clear, hyphae growth within roots tissues. Since *F. arundinacea* showed no pathogenic responses derived from *Lewia* sp. under aseptic conditions, we decided to evaluate the effect of *Lewia* sp. inoculation on plant growth, using different hydrocarbon-contaminated matrices. Plant growth was evaluated after 45 days of culture in either contaminated perlite or soil (Figs. 3 and 4). In contaminated perlite,

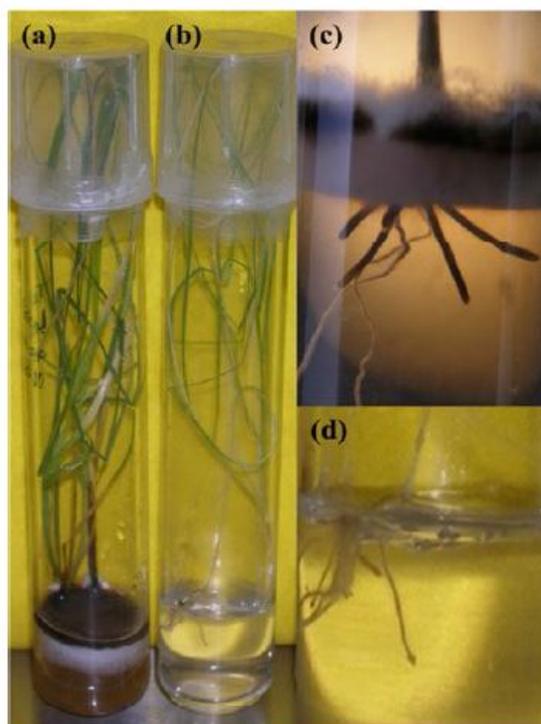


Fig. 1 *F. arundinacea* growing on MS medium: **a** inoculated, **b** non-inoculated with *Lewia* sp. Roots in MS medium: **c** inoculated, **d** non-inoculated with *Lewia* sp. after 60 days of culture, in all cases

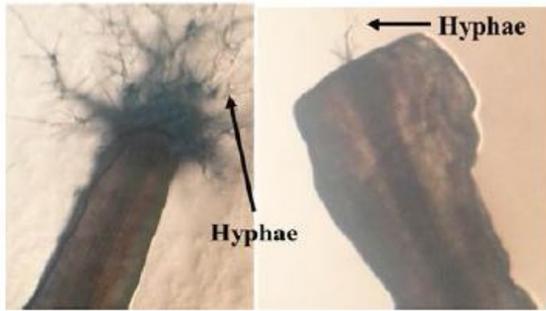


Fig. 2 *Lewia* sp. colonisation within the tissues of *F. arundinacea* roots, after 60 days of culture, under aseptic conditions

the plants produced shoots with a 31 % reduction in length compared to the control (without HM). In contaminated soil, there were no significant differences in shoot length due to the HM. The presence of *Lewia* sp. had no significant effect on the shoot length of plants grown in either perlite or soil (Fig. 3). Root and shoot biomass was lower in contaminated perlite or soil, for both inoculated and non-inoculated plants. *Lewia* sp. clearly stimulated root biomass production when *F. arundinacea* was grown in contaminated perlite (Fig. 4).

Hydrocarbon removal and accumulation

The efficiency of removal of HXD, PHE, and PYR by inoculated and non-inoculated *F. arundinacea* grown

in perlite or soil after 45 days of culture is shown in Table 1. Inoculated plants showed higher PHE removal compared to non-inoculated plants in perlite and soil. In soil, PYR removal by inoculated *F. arundinacea* (97.9 %) was also significantly higher than that by non-inoculated plants (91.4 %). In perlite, PYR removal by inoculated *F. arundinacea* was 37-fold higher than that by non-inoculated plants. Root accumulation of PYR was only detected in *F. arundinacea* inoculated with *Lewia* sp. Shoot accumulation of PYR and PHE was not detected in either inoculated or non-inoculated plants grown in soil.

Discussion

The filamentous fungus isolated from surface-sterilized *F. arundinacea* seeds was found to be similar to the genus *Lewia*. Kwasna and Kiosak (2003) isolated other species of the genus *Lewia* from surface-sterilized oat seeds, identified as *L. avenicola*. Similarly, Kwasna et al. (2006) isolated *L. hordecicola* from barley seeds. The use of *Lewia* strains for phytoremediation purposes can be questioned because *Alternaria* sp. is the anamorph of *Lewia* sp. and *Alternaria* includes many species of plant pathogens (Kwasna et al. 2006). Nevertheless, recent studies have described a non-phytopathogenic *Lewia* species, *L. eureka*, isolated from the stem tissue of *Theobroma*

Fig. 3 Shoot length of *F. arundinacea* after 45 days of growth in contaminated perlite and soil with or without inoculation with *Lewia* sp. Different letters (uppercase soil and lowercase perlite) represent significant differences according to the Tukey-Kramer test ($\alpha=0.05$). Mean of three replicates \pm SD. Open columns non-inoculated and filled columns inoculated

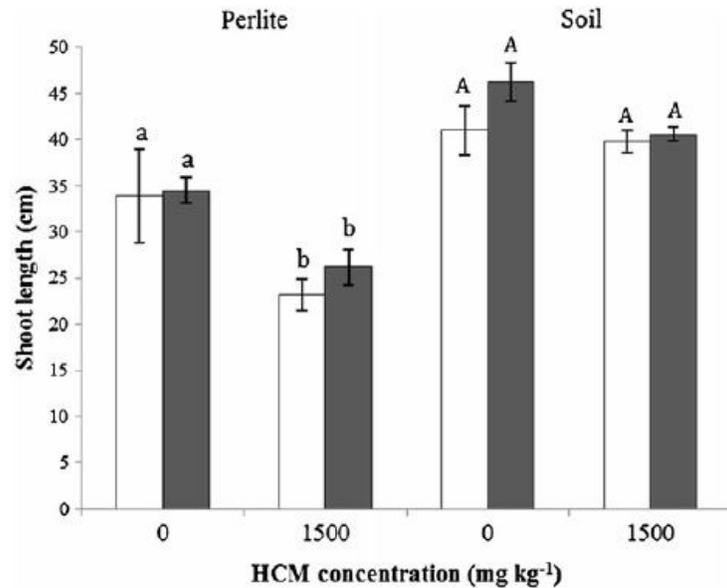
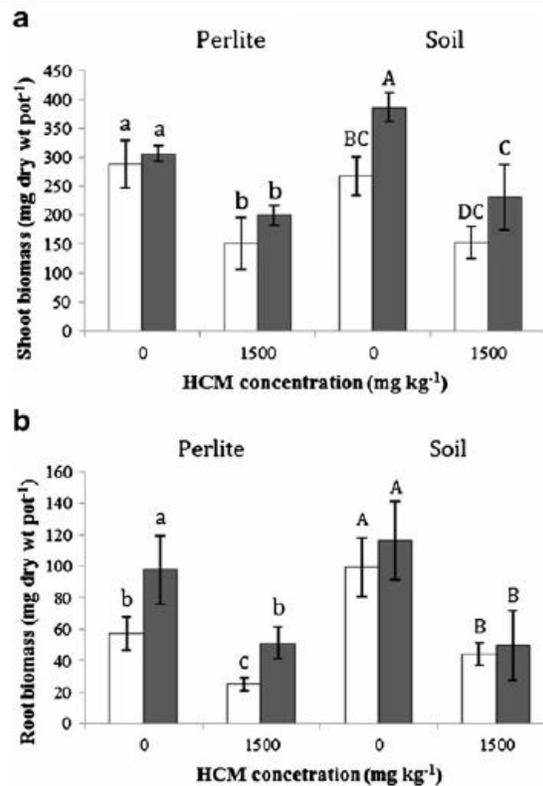


Fig. 4 Shoot (a) and root (b) biomass of *F. arundinacea* after 45 days of growth in contaminated perlite and soil with or without inoculation with *Lewia* sp. Different letters (uppercase soil and lowercase perlite) represent significant differences according to the Tukey-Kramer test ($\alpha=0.05$). Mean of three replicates \pm SD. Open columns non-inoculated and filled columns inoculated



gileri and characterized as a fungal endophyte (Thomas et al. 2008).

F. arundinacea is tolerant to petroleum hydrocarbons, as demonstrated by its frequent occurrence on polluted road-sides (Gawronski and Gawrosnska 2007). The genus *Festuca* belongs to the *Poaceae*

family, one of the most important plant families for phytoremediation of organic compounds (Gawronski and Gawrosnska 2007; Cheema et al. 2009; Soleimani et al. 2010). This family and certain fungal genera show evidence of establishing endophytic associations. According to Lugtenberg et al. (2002), and

Table 1 Hexadecane (HXD), phenanthrene (PHE) and pyrene (PYR) removal by *F. arundinacea*, with or without inoculation with *Lewia* sp., after 45 days of culture in perlite and soil

	Perlite			Soil		
	Removal (%)			Removal (%)		
	PYR	PHE	HXD	PYR	PHE	HXD
Control	2.7 \pm 2.4 b	80.1 \pm 3.4 b	76.0 \pm 1.2 b	66.8 \pm 3.7 C	66.0 \pm 0.6 D	65.6 \pm 3.1 B
<i>Lewia</i> sp.	9.5 \pm 5.6 b	82.2 \pm 4.0 b	78.8 \pm 1.3 b	69.9 \pm 1.2 C	73.7 \pm 0.2 C	60.4 \pm 7.8 B
<i>F. arundinacea</i>	1.9 \pm 0.7 b	85.2 \pm 4.1 b	74.5 \pm 6.8 ba	91.4 \pm 1.2 B	91.9 \pm 0.1 B	94.2 \pm 1.4 A
<i>F. arundinacea</i> - <i>Lewia</i> sp.	70.3 \pm 7.2 a	100 \pm 0.0 a	91.7 \pm 6.9 a	97.9 \pm 0.8 A	99.9 \pm 0.1 A	95.1 \pm 0.8 A
Initial mass (mg pot ⁻¹)	12.7 \pm 1.4	12.3 \pm 1.5	24.6 \pm 2.8	124.8 \pm 3.9	111.6 \pm 8.9	176.4 \pm 8.0

Different letters (uppercase soil and lowercase perlite assays) represent significant differences among treatments: *Lewia* sp.; *F. arundinacea* and *F. arundinacea* and *Lewia* sp., and control (perlite or soil) for each hydrocarbon. The means were compared at a significance level of $\alpha=0.05$. Mean of three replicates \pm SD

based on their effects on the plant, *Lewia* sp. that interacts with *F. arundinacea* can be considered as beneficial microorganism. Commonly, endophytic fungi are vertically transmitted via host seeds in most mutualistic associations (Schardl et al. 2004). In our work, *Lewia* sp. was isolated from previously surface-sterilized seeds and was probably vertically transmitted via *F. arundinacea* seeds. However, endophytic microbes may also be parasitic, *i.e.* detrimental to their hosts (Paparou et al. 2007). For this reason, our first goal was to rule out any pathogenic responses derived from *Lewia* sp. in *F. arundinacea*. As shown in Fig. 1, *Lewia* sp. had positive effects; in contrast, plant growth increased in the presence of *Lewia* sp. compared with non-inoculated plants (Fig. 1). *Lewia* sp. established an endophytic interaction with *F. arundinacea* (Fig. 2). It was transmitted via *F. arundinacea* seeds and consequently it had a positive effect on plant growth. Therefore, it is not surprising that *Lewia* sp. had a significant effect on the growth of both roots and shoots under aseptic conditions. Similar results were observed when *F. arundinacea* was grown on spiked perlite; root biomass production was higher in inoculated compared to non-inoculated plants (Fig. 4). These results may be attributed to the high porosity (>80 %) of perlite (Martínez et al. 2006), which provides the appropriate aeration and moisture for fungal growth. The positive effect on plant growth detected in the presence of *Lewia* sp. was not observed when *F. arundinacea* was grown on contaminated soil, suggesting possible competition with native microbes.

Plant–microbe interactions in the rhizosphere offer a useful means for remediating hydrocarbon-contaminated soils (Cheema et al. 2009; Mohsenzadeh et al. 2010). Certain plant roots release substances that are nutrients for microorganisms like bacteria and fungi (Sinha et al. 2007). In some cases, the degradation process can be promoted by rhizospheric microorganisms (Kuiper et al. 2004). In the present study, a mycelial suspension was inoculated in the rhizosphere of *F. arundinacea* in order to promote hydrocarbon removal. *F. arundinacea* inoculated with *Lewia* sp. was able to remove all of the initial PHE from both perlite and soil (Table 1). Our results are consistent with those reported by Soleimani et al. (2010), who found that *Neotyphodium coenophialum*-infected *F. arundinacea* was able to remove all of the initial PHE from aged soil. In our work, the removal of PYR, one of the most potent carcinogenic PAH, by *F. arundinacea* was significantly improved by inoculation with *Lewia* sp. in perlite. Beneficial microorganisms are often used as inoculants in the phytoremediation of organic contaminants (rhizoremediators). Most environmental contaminants with organic compounds can be degraded by beneficial rhizoremediators (Lugtenberg et al. 2002). Our results suggest that *Lewia* sp. can be considered as a beneficial rhizoremediator, by stimulating hydrocarbon uptake. Plant uptake is one of the steps in the phytoremediation of soil contaminated with organic compounds. Information about the final plant PAH concentration is essential to predict the effectiveness of a phytoremediation operation (Gao and Ling 2006). Recent studies have

Table 2 Final concentration of hexadecane (HXD), phenanthrene (PHE) and pyrene (PYR) in root and shoot, with or without inoculation with *Lewia* sp., after 45 days of culture in perlite and soil

	Perlite			Soil		
	PYR mg kg ⁻¹	PHE	HXD	PYR mg kg ⁻¹	PHE	HXD
Roots	n.d.	n.d.	n.d.	694.7±246	n.d.	1,603.4±84.7
Roots (inoculated)	318±162	n.d.	490±300	1,603.4±336	n.d.	1,404.3±56
Shoots	n.d.	n.d.	445±11	n.d.	n.d.	309±103
Shoots (inoculated)	20.7±16.9	n.d.	358.8±26	n.d.	n.d.	136.5±79
Initial conc. *mg kg ⁻¹	357.8±27	328.5±38.5	639±96.2	317.9±8.0	284.2±20.9	451.7±26.9

n.d. not detected

mg hydrocarbons kg⁻¹ dry tissue, roots or shoots

*mg hydrocarbons kg⁻¹ dry support, perlite or soil

The values are means of three replicates ± CI

demonstrated that *F. arundinacea* is able to accumulate and degrade PAH by using phytodegradation mechanism (Su et al. 2008; Reynoso-Cuevas et al. 2011). However, it is not yet clear how interactions between plants and specific microorganisms stimulate the same phytoremediation mechanisms. In our opinion, the simplest way to elucidate such an interesting association would be to investigate the final fate of each of the assayed hydrocarbons. According to Reynoso-Cuevas et al. (2011), after 90 days of growth in MS medium under aseptic conditions, *F. arundinacea* was able to accumulate 46.7 and 15.95 mg PYR (kg dry tissue)⁻¹ in roots and shoots, respectively. In the present study, after 45 days of culture in spiked perlite, the root accumulation of PYR was 6.8-fold higher in *F. arundinacea* inoculated with *Lewia* sp. than reported by Reynoso-Cuevas et al. (2011). When soil was used as the growth medium, there were no significant differences in the concentration of PYR in roots of inoculated and non-inoculated plants. This difference could be explained by two different features: (i) the presence of native microorganisms in the soil that may be involved in the degradation of hydrocarbons and (ii) soil organic matter that plays a crucial role in the fate and transport of many organic contaminants like hydrocarbons (Karthikeyan and Kulakow 2003). Su et al. (2008) reported that PYR was not detected in the shoots of *F. arundinacea* after 8 weeks of growth in aged contaminated soil. In this work, PYR was not detected in shoots when *F. arundinacea* was grown in inoculated or non-inoculated soil (Table 2). Our results suggest that the transport of PYR from roots to shoots was restricted to the interaction between *F. arundinacea*–*Lewia* sp., these results suggest that our technological approach in the laboratory could also be applied in the field, because the absence of translocation of contaminants from the roots to the shoots means that toxic organic contaminants are not transferred into the food chain (Gao and Ling 2006). As shown in this study, *Lewia* sp. inoculation in the rhizosphere promotes the accumulation of pyrene in roots and hydrocarbon removal by *F. arundinacea* in contaminated perlite and soils.

Acknowledgments A. Cruz-Hernández received a fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). This research was partially supported by Petróleos Mexicanos (PEMEX)-Refinación.

References

- Acevedo F, Pizzul L, Castillo MP, Cuevas R, Diez MC (2011) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthraco-phyl-llum discolor*. *J Hazard Mater* 185:212–219
- Cemiglia CE, Sutherland JB (2010) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. In: Timmis KN (ed) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 2079–2110
- Chaudhry Q, Blom-Zandstra M, Gupta S, Joner EJ (2005) Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environ Sci Pollut Res Int* 12:34–48
- Cheema SA, Khan MI, Tang X, Zhang C, Shen C, Malik Z, Ali S, Yang J, Shen K, Chen X, Chen Y (2009) Enhancement of phenanthrene and pyrene degradation in rhizosphere of tall fescue (*Festuca arundinacea*). *J Hazard Mater* 166:1226–1231
- Chiapusio G, Pujol S, Toussaint ML, Badot PM, Binet P (2007) Phenanthrene toxicity and dissipation in rhizosphere of grassland plants (*Lolium perenne* L. and *Trifolium pratense* L.) in three spiked soils. *Plant Soil* 294:103–112
- Dugay A, Herrenknecht C, Czok M, Guyon F, Pages N (2002) New procedure for selective extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in plants for gas chromatographic–mass spectrometric analysis. *J Chromatogr A* 958:1–7
- Escalante-Espinosa E, Gallegos-Martínez ME, Favela-Torres E, Gutiérrez-Rojas M (2005) Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere* 59:405–413
- Gan S, Lau EV, Ng HK (2009) Remediation of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J Hazard Mater* 172:532–549
- Gao Y, Ling W (2006) Comparison for plant uptake of phenanthrene and pyrene from soil and water. *Biol Fertil Soils* 42:387–394
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2:113–118
- Gawronski SW, Gawrosnska H (2007) Plant taxonomy for phytoremediation. In: Samotokin B, Marmiroli M, Marmiroli N (eds) *Advanced science and technology for biological decontamination of sites affected by chemical and radiological nuclear agents*. Springer, Netherlands, pp 79–88
- Karthikeyan R, Kulakow PA (2003) Soil plant microbe interactions in phytoremediation. In: Scheper T (ed) *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 51–74
- Kuiper I, Legendijk EL, Bloemberg GV, Lugtenberg BJ (2004) Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 17:6–15
- Kwasna H, Kiosak B (2003) *Lewia avenicola* sp. nov. and its *Alternaria* anamorph from oat grain, with a key to the species of *Lewia*. *Mycol Res* 107:371–376
- Kwasna H, Ward E, Kosiak B (2006) *Lewia hordeicola* sp. nov. from barley grain. *Mycol* 98:662–668
- Larena I, Salazar O, González V, Julián MC, Rubio V (1999) Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed

- spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *J Biotechnol* 75:187–194
- Lazcano EA, Guerrero-Zuñiga LA, Rodriguez-Tovar A, Rodriguez-Dorantes A, Vasquez-Murrieta MS (2010) Rhizospheric plant-microbe interactions that enhance the remediation of contaminated soil. In: Méndez-Vilas A (ed) *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Microbiology Book Series, Formatex Research Center, Spain, pp 251–256
- Lugtenberg BJJ, Chin-A-Woeng TF, Bloemberg GV (2002) Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:373–383
- Martínez DA, Landini AM, Svartz H, Vence L, Bottini L, Mascarini L, Orden S, Vilella F (2006) Physical and hydraulic properties of perlites used in rose cultures and their dependency on time. *Ci Suelo* 24:177–182
- Mohsenzadeh F, Nasser S, Mesdaghinia A, Nabizadeh R, Zafari D, Khodakaramian G, Chehregani A (2010) Phytoremediation of petroleum-polluted soil: application of *Polygonum aviculare* and its root-associated (penetrated) fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:613–619
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Ndimele PE (2010) A review on the phytoremediation of petroleum hydrocarbons. *Pak J Biol Sci* 13:715–722
- Paparu P, Dubois T, Coyne D, Viljoen A (2007) Defense-related gene expression in susceptible and tolerant bananas (*Musa spp.*) following inoculation with non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes and challenge with *Radopholus similis*. *Physiol Mol Plant Pathol* 71:149–157
- Pilon-Smits E (2005) Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol* 56:15–39
- Reynoso-Cuevas L, Gallegos-Martínez ME, Cruz-Sosa F, Gutiérrez-Rojas M (2011) Phytoremediation and removal mechanisms in *Bouteloua curtipendula* growing in sterile hydrocarbon spiked cultures. *Int J Phytoremediat* 13:613–625
- Schardl CL, Leuchtman A, Spiering MJ (2004) Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annu Rev Plant Biol* 55:315–340
- Sinha RK, Herat S, Tandon PK (2007) Phytoremediation: role of plant in contaminated site management. In: Singh SN, Tripathi RD (eds) *Environmental bioremediation technologies*. Springer, Berlin, pp 315–330
- Soleimani M, Afyuni M, Hajabbasi MA, Nourbakhsh F, Sabzalian MR, Christensen JH (2010) Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. *Chemosphere* 81:1084–1090
- Srogi K (2007) Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environ Chem Lett* 5:169–195
- Su Y, Yang X, Chiou CT (2008) Effect of rhizosphere on soil microbial community and in-situ pyrene biodegradation. *Front Environ Sci Engin China* 2:468–474
- Sudip SK, Singh OV, Jain RK (2002) Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol* 20:243–248
- Tarkka M, Schrey S, Hampp R (2008) Plant associated soil micro-organisms. In: Nautiyal CS, Dion P (eds) *Molecular mechanisms of plant and microbe coexistence*. Springer, Berlin, pp 3–51
- Thomas SE, Crozier J, Catherine Aime M, Evans HC, Holmes KA (2008) Molecular characterisation of fungal endophytic morphospecies associated with the indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador. *Mycol Res* 112:852–860

México, D. F. a 22 de Mayo del 2013

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

**Estudio de los mecanismos de fitorremediación de *Festuca arundinacea* en interacción
con un hongo filamentoso en presencia de hidrocarburos.**

Que presentó

M. en B. Areli Cruz Hernández

Comité Tutorial:

Director: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
Asesor: Dra. Araceli Tomasini Campocosio
Asesor: Dra. Laura Josefina Pérez Flores

Jurado:

Presidente:

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa  Dra. Araceli Tomasini Campocosio

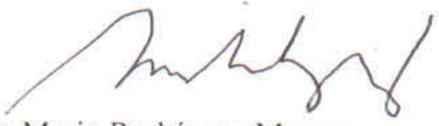
Secretario:

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa  Dr. Francisco José Fernández Perrino

Vocal:

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa  Dra. Laura Josefina Pérez lores

Vocal:

CEPROBI-IPN -Yautepec, Morelos.  Dr. Mario Rodríguez Monroy