



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA**

UNIDAD IZTAPALAPA

SELECCIÓN *IN VITRO* DE PLANTAS TOLERANTES A
PLOMO PARA SU USO EN FITORREMEDIACION

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN
BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

FATIMA KARMINA SALAS SALMERON

ASESOR DE TESIS: DRA. TANIA L. VOLKE SEPÚLVEDA

LECTOR: DR. MARIANO GUTIERREZ ROJAS

LABORATORIO DE RESIDUOS SÓLIDOS (W-108)

MEXICO, D.F.

OCTUBRE DE 2007

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a mi asesora la Dra. Tania L. Volke Sepúlveda y al Dr. Mariano Gutiérrez Rojas, por creer en mi y darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por los consejos y su apoyo para la realización de esta tesis.

Al Dr. Ernesto Favela, por todas las facilidades que me brindo y por su apoyo.

A mis padres y hermanas que siempre han estado conmigo apoyándome en cada proyecto que realizo.

A los colaboradores y compañeros del W-108 de quienes sus consejos y observaciones fueron de gran ayuda.

Y a todas las personas que me han estado conmigo en todo este proceso.

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	3
1.1.	La contaminación de suelos por metales pesados	3
1.2.	El plomo como contaminante ambiental	3
1.3.	Efecto del plomo en plantas	4
1.4.	Biorremediación de suelos contaminados con metales.....	5
1.5.	Fitorremediación de suelos contaminados con metales	6
1.6.	Selección de plantas fitorremediadoras	7
1.7.	Uso de agentes quelantes	8
2.	JUSTIFICACIÓN	10
3.	OBJETIVOS	11
3.1.	Objetivo general	11
3.2.	Objetivos particulares	11
4.	MÉTODOS Y MATERIALES	12
4.1.	Sitios de muestreo	12
4.2.	Recolección de semillas.....	13
4.3.	Pretratamiento y germinación de semillas en condiciones in vitro	13
4.4.	Efecto de la concentración de EDTA en el crecimiento.....	15
4.5.	Efecto de la concentración de plomo en el crecimiento y acumulación	15
4.6.	Determinación del índice de tolerancia a plomo	15
4.7.	Efecto del ácido indolacético en el crecimiento y acumulación de Pb por <i>A. farnesiana</i>	16
4.8.	Análisis y cuantificación de plomo	16
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
5.1.	Especies en estudio.....	18
5.2.	Selección de condiciones para cultivos in vitro	18
5.3.	Análisis y cuantificación de plomo en plantas	19
5.4.	Efecto del EDTA en el crecimiento.....	20
5.5.	Efecto del plomo en la germinación y crecimiento	22
5.6.	Capacidad de fitoacumulación de plomo por <i>A. farnesiana</i> y <i>D. viscosa</i>	27
5.7.	Efecto del AIA en el crecimiento y acumulación de Pb por <i>A. farnesiana</i>	28
6.	CONCLUSIONES.....	31
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1. *La contaminación de suelos por metales pesados*

La disposición final de los residuos generados por la explotación minera durante siglos de actividad ha ocasionado muchos problemas ambientales en el país, entre los que se encuentran la contaminación de suelos y acuíferos, la pérdida de la cobertura vegetal y la formación de estructuras poco consolidadas susceptibles a la erosión eólica e hídrica (Moore y Luoma, 1990; Salomons, 1995). La introducción al ambiente de sustancias tóxicas en los procesos de beneficio, así como la generación de acidez y liberación de metales pesados al exponer a los minerales de los yacimientos a un ambiente oxidante, son algunas de las principales fuentes de contaminación ambiental propiciadas por la industria minera (Moore y Luoma, 1990; Dudka y Domy 1997; Gray, 1997).

Un ejemplo de lo anterior, se encuentra en el Estado de Guanajuato, específicamente en el Distrito Minero de Guanajuato, que es actualmente uno de los mayores productores de plata en el mundo, y ha sido explotado para la producción de plata y oro desde 1548. Este sitio forma parte del cinturón mineralizado, que corre paralelo al flanco este de la Sierra Madre Occidental, de Taxco (México central sur) a Guanajuato (México central) y Santa Bárbara Chihuahua (México norte) (Clark y col., 1982). En el Distrito de Guanajuato se han generado y depositado al aire libre aproximadamente 95 millones de toneladas de residuos, provenientes de vetas epitermales. Estos residuos, conocidos como jales, son lodos residuales originados durante el proceso de beneficio del mineral económicamente aprovechable. Algunos jales pueden generar acidez, así como liberar elementos potencialmente tóxicos, comúnmente denominados metales pesados (As, Cd, Cu, Pb, Se, Zn y Hg) (Volke-Sepúlveda y col., 2005). Los elementos tóxicos más comunes derivados de los procesos de minería, encontrados en México, son Pb, Cd, Zn, As, Se y Hg (Gutiérrez y Moreno, 1997; Gutiérrez, 2003).

Desde la segunda mitad de los años 80 y durante los años 90, la investigación acerca del impacto de actividades mineras en el medio ambiente, se ha incrementado considerablemente. Algunas de estas investigaciones han sido enfocadas hacia los efectos del drenaje ácido y la alta concentración de metales pesados en superficies, aguas subterráneas y suelos, así como hacia alternativas tecnológicas para la remediación de sitios contaminados (Alpers y col., 1994; Howell, 1994; King, 1995; Fyfe, 1998; Larocque y Rasmussen, 1998; Rosner, 1998).

1.2. *El plomo como contaminante ambiental*

Algunos metales pesados como el Cu, Zn y Ni son micronutrientes esenciales para las plantas, pero son tóxicos para los organismos en altas concentraciones, éstos pueden causar desordenes metabólicos e inhibir el crecimiento de algunas especies vegetales (Fernández y Henriques, 1991; Claire y col., 1991; Munzuroghu y Geckil 2002).

Otros elementos, como el plomo (Pb^{2+}) y el zinc (Zn^{2+}) son contaminantes que se encuentran en grandes cantidades en el ambiente, particularmente en áreas con alta presión antropogénica

(Wierzbicka 1995; Sresty y Rao 1999; Talanova y col., 1999; Herrero y col., 2003). El exceso de estos elementos en el ambiente puede causar serios problemas a todos los organismos (Xiong 1997; Sresty y Rao, 1999) y su bioacumulación en la cadena alimenticia es altamente peligrosa (Wierzbicka, 1995; Sanita di Toppi y Gabbrielli, 1999).

El Pb es uno de los metales pesados conocido desde la antigüedad y está ganando considerable importancia como un potente contaminante ambiental, altamente tóxico para el hombre. Su presencia en el ambiente se debe principalmente a actividades antropogénicas como la industria, minería y al uso de las gasolinas con plomo y disposición de ciertos desechos industriales (Chaney y Ryan, 1994; Cooper y col., 1999). El Pb originado de dichas actividades puede permanecer como residuo por 1000 a 3000 años en los suelos de clima templado (Bowen, 1979). Dicho metal se acumula en las capas superficiales del suelo y, por lo tanto, es difícil medir confiablemente su concentración. Su disponibilidad depende de las condiciones del suelo, como el tamaño de partícula, la capacidad de intercambio catiónico y de factores de las plantas, como la superficie y exudados de la raíz, micorrización y de la transpiración (Davies, 1995)

El Pb no solo afecta el crecimiento de las plantas y su productividad, sino que entra en la cadena alimenticia, causando daños en la salud del hombre y animales (Seaward y Richardson, 1991). Dicho metal tiene efectos tóxicos en muchos órganos, sistemas y procesos fisiológicos, incluyendo el desarrollo de la línea roja hemática, los riñones, el sistema cardiovascular, el aparato reproductor y, probablemente el aspecto de mayor gravedad, el desarrollo del sistema nervioso central. La naturaleza de las manifestaciones de toxicidad depende no sólo de la magnitud de la exposición sino también de las características de la persona expuesta; la neurotoxicidad del Pb es más crítica para el feto en desarrollo y el niño en crecimiento que para los adultos (Sanin y col., 1998)

1.3. Efecto del plomo en plantas

En ciertas ocasiones, las plantas se encuentran expuestas a metales pesados no esenciales incluyendo Hg^{2+} , Cd^{2+} y Pb^{2+} , presentes en el suelo y agua naturalmente, o bien, como contaminantes generados por actividades humanas (Weiqiang y col., 2005). En sitios contaminados con Pb y otros metales pesados, la estructura de la vegetación y biodiversidad se encuentra reducida, usualmente se observan parches en el suelo y los árboles están esparcidos o ausentes (Wickland, 1990).

En las plantas, las altas concentraciones de metales pesados inhiben la germinación de semillas, el crecimiento y desarrollo, además de alterar muchos procesos bioquímicos y fisiológicos. Por ejemplo, su presencia daña las membranas de las células, reduce la transpiración, impide la síntesis de proteínas, daña e inhibe la fotosíntesis y afecta la actividad de varias enzimas. Los metales pesados afectan también la radícula saliente y el crecimiento de la planta (Foy y col., 1978; Sanita di Toppi y Gabbrielli, 1999; Salanova y col., 2000; Monni y col., 2001, Atici y col., 2003). El efecto de los metales pesados en la germinación de semillas puede depender de su penetración a través de la cubierta de la semilla, lo cual puede alterar

una serie de procesos fisiológicos involucrados en la germinación (Seregin y Kozhevnikora, 2004; Lane y Martin 1977). En algunas especies de plantas, el Pb penetra fácilmente la cubierta de la semilla, lo que impide su germinación (Wierzvicka y Obidzinska, 1998).

Sin embargo, existen especies vegetales endémicas de suelos metalíferos que pueden tolerar grandes e inusuales cantidades de metales u otros componentes tóxicos (Banuelos y col., 1997; Blaylock y Huang, 2000; Raskin y Ensley, 2000; Dahmani-Muller y col., 2000). Se ha demostrado que en este tipo de plantas tolerantes a la presencia de metales pesados, como el Pb, las raíces tienen una habilidad para captar cantidades significativas de Pb mientras que, simultáneamente, se restringe su desplazamiento hacia las partes aéreas (Lane y Martin 1977). La mayor parte del Pb captado por las plantas permanece en las raíces (Kumar y col., 1995). En este sentido, la distribución de metales pesados en las células y tejidos de las plantas varía dependiendo en la concentración del metal en el medio, de la duración de la exposición y de las propiedades físicas y químicas del ión, lo que determina la factibilidad de que éste pase a través de las barreras fisiológicas (Sharma y Dubey, 2005).

1.4. Biorremediación de suelos contaminados con metales

El termino “tecnología de remediación” implica el uso de cualquier operación unitaria o un conjunto de ellas, que altere la composición de un contaminante peligroso a través de acciones químicas, físicas o biológicas de manera que reduzcan su toxicidad, movilidad o volumen en la matriz o material contaminado (Volke-Sepúlveda y col., 2005).

Las tecnologías de remediación representan una alternativa a la disposición en tierra de residuos peligrosos sin tratamiento y sus posibilidades de éxito, bajo las condiciones específicas de un sitio, pueden variar ampliamente (US EPA 2001). Antes de considerar la aplicación de cualquier tecnología de remediación, es fundamental conocer ciertas características, tanto del suelo (factores ambientales), como del contaminante y de los organismos vivos (plantas, hongos, bacterias etc.) presentes en el sitio.

Factores ambientales: dentro de los factores más importantes para la remediación de un suelo se encuentran las condiciones ambientales (temperatura, humedad, pH, etc.) y las características fisicoquímicas del suelo.

Características de los contaminantes: la naturaleza y características del contaminante son variables de suma importancia para el éxito o fracaso de un proceso de remediación, dentro de las más importantes se encuentran: toxicidad, concentración, disponibilidad, solubilidad y sorción del contaminante a las superficies sólidas.

Factores biológicos: es un factor determinante para la aplicación de tecnologías biológicas. Este tipo de factores implica la verificación de la existencia de poblaciones de organismos y plantas nativas con capacidad para degradar o transformar el contaminante

Desde hace décadas se han propuesto algunas tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales, incluyendo tratamientos térmicos, biológicos y fisicoquímicos. Sin

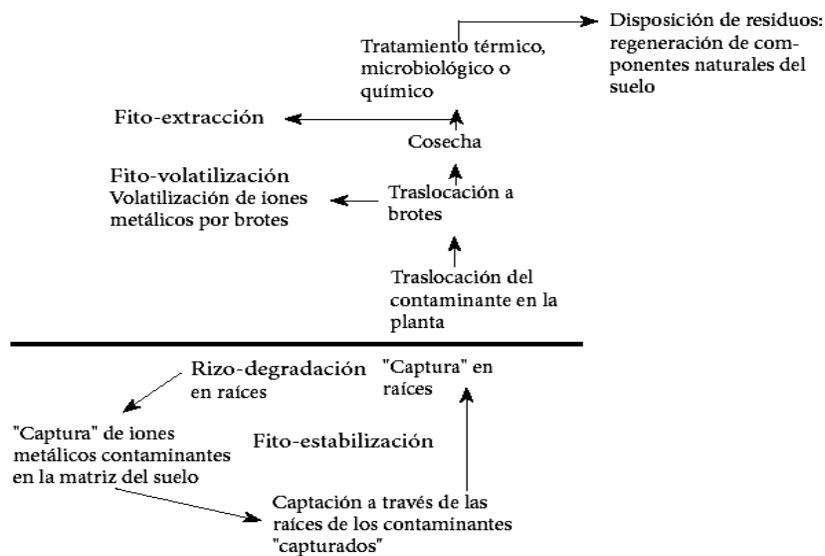
embargo, los tratamientos térmicos no son efectivos para remover metales pesados del suelo contaminado. Los tratamientos fisicoquímicos frecuentemente son caros y destruyen la estructura del suelo, además de reducir su productividad (Ma y col., 1993, Leumann y col., 1995). A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales no pueden descomponerse por vía biológica, física ni química, de manera que la remediación de sitios contaminados con metales o metaloides se limita a la alteración de su solubilidad, movilidad y/o toxicidad (Stephen y Macnaughton 1999, Bosecker 2001).

La biorremediación de un suelo implica su descontaminación por vía biológica (Volke-Sepúlveda y col., 2005). El término biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan el potencial metabólico de organismos vivos (plantas, hongos y bacterias, entre otros) para limpiar ambientes contaminados (Van Deuren y col., 2002, Watanabe 2001). Una estrategia de biorremediación que puede aplicarse de manera efectiva en sitios contaminados con metales es la fitorremediación.

1.5. Fitorremediación de suelos contaminados con metales

La fitorremediación es una nueva alternativa tecnológica de biorremediación, que puede utilizarse para la remoción y/o estabilización de elementos tóxicos en suelos contaminados (Salt y col., 1995). Esta técnica consiste en el uso de plantas para limpiar suelos y agua, y está cobrando gran importancia debido a su eficiencia en cuanto a costos, además de que es una tecnología ambientalmente amigable. Las plantas tienen una habilidad única para captar y concentrar elementos esenciales y no esenciales del suelo a través de sus raíces. De esta manera, las plantas hiperacumulan metales para, selectivamente, remover y reciclar el exceso de metales tóxicos presentes en un suelo contaminado.

La fitorremediación de metales incluye a su vez varios mecanismos, tales como la fitoextracción, la fitoestabilización, la rizofiltración y la fitovolatilización (Raskin y Ensley, 2002). Estos mecanismos se describen brevemente en la Figura 1.



Fuente: Singh *et al.* 2003.

Figura 1. Procesos involucrados en la fitorremediación del suelo

1.6. Selección de plantas fitorremediadoras

El cultivo de plantas para remediar suelos contaminados con metales pesados puede proveer una tecnología barata y sustentable para la biorremediación. El éxito de cualquier estrategia de fitorremediación depende de la identificación de especies de plantas adecuadas, que acumulen altas concentraciones de metales y produzcan grandes cantidades de biomasa. Pocas son las especies de plantas adaptadas para sobrevivir en suelos contaminados con altas concentraciones de metales. Estas especies se dividen principalmente en dos grupos: las llamadas pseudometalofitas, que crecen tanto en suelos no contaminados como en suelos contaminados; y las metalofitas, que crecen solo en suelos contaminados con metales y/o naturalmente ricos en ellos (Baker, 1987).

Las plantas que acumulan altas concentraciones de metales en cualquier parte de sus tejidos se conocen como hiperacumuladoras. En general, se considera que una planta es hiperacumuladora cuando la concentración de metal es al menos de 1000 mg/kg en la materia seca de cualquier tejido aéreo, cuando la planta crece en su hábitat natural (Reeves, 1992). Generalmente las concentraciones en brotes, usadas como criterio para definir especies hiperacumuladoras se encuentran entre 1 y 5% en peso seco. Específicamente 0.1% para Ni, Co, Cu y Pb; 1.0% para Zn y 0.01% para Cd (Baker y col., 2000).

Se ha reportado una gran biodiversidad de especies con potencial, probado en campo y en laboratorio, para la fitorremediación. A la fecha, se han identificado 163 taxones de plantas, pertenecientes a 45 familias, tolerantes a los metales y capaces de crecer en concentraciones elevadas. Entre las angiospermas se han identificado cerca de 400 hiperacumuladoras; entre las

familias dominantes se encuentran: Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Cyperaceae, Cunouniaceae, Fabaceae, Flacourtiaceae, Lamiaceae, Poaceae, Violaceae y Europhobiaceae. De estas familias, Brassicaceae tiene el mayor numero de taxones, 11 géneros y 87 especies, con capacidad para hiperacumular metales (Prasad y Freitas, 2003).

Un prerrequisito para la hiperacumulación de metales, es la capacidad de una especie para tolerar eficientemente altas concentraciones de metales dentro de sus tejidos y células. Las plantas hiperacumuladoras de metales tienen la habilidad de solubilizar metales del suelo, absorbiéndolos en sus raíces y translocándolos hasta sus brotes (Pollard y col., 2002). La superficie de la raíz está específicamente desarrollada para captar los nutrientes elementales presentes en el suelo y en soluciones. Algunas de las plantas acumuladoras de metales liberan componentes que atrapan los metales en la rizósfera, lo cual ayuda a su solubilización y captación, como en el caso del hierro (Ma y Nomoto, 1996), el aluminio (Pellet y col., 1995) y, posiblemente, el zinc (Cakmak y col., 1996a, 1996b).

El principal mecanismo en especies tolerantes a metales, parece ser la captación en el compartimento vacuolar, la aparente tolerancia de las plantas para incrementar niveles de elementos tóxicos en sus tejidos puede ser resultado de la exclusión de los mismos elementos tóxicos de los sitios celulares donde se llevan a cabo los procesos vitales, tales como la división celular y la respiración. Lo anterior provee a la planta con un efectivo mecanismo de protección (Chaney y col., 1997; Hall 2002).

Para la adecuada limpieza, por fitorremediación, de un suelo contaminado con metales, es necesaria la selección adecuada de especies de plantas. Una planta adecuada para fitorremediación debe poseer las siguientes características (Raskin y col., 1997):

1. Capacidad para acumular metales, preferentemente en sus partes aéreas.
2. Tolerancia a la concentración del metal acumulado
3. Rápido crecimiento y grandes cantidades de biomasa
4. Sistema radicular extenso, raíces profundas y ramificadas
5. Fácil de cosechar

1.7. *Uso de agentes quelantes*

El Pb es uno de los metales más tóxicos en el medio ambiente, y posee una limitada solubilidad en suelos y disponibilidad para plantas. Sin embargo, para fitorremediar un sitio contaminado con Pb, es necesario aumentar su biodisponibilidad para las plantas. Es posible incrementar la biodisponibilidad de un contaminante metálico, como el Pb, a través del uso de ciertos agentes quelantes que pueden adicionarse al suelo. Un agente quelante es un compuesto químico capaz de fijar o secuestrar iones metálicos formando compuestos estables llamado quelatos (Smith, 2003).

La elección de agentes apropiados para la extracción de ciertos metales de un suelo contaminado, es el primer problema que debe resolverse para mejorar la fitorremediación. Para

lograr una extracción eficiente, la solubilización de metales pesados debe favorecerse; esta solubilización se basa principalmente en la capacidad de los agentes quelantes orgánicos para formar complejos órgano-metálicos solubles (Martell y Calvin, 1985). Algunos estudios muestran que una vez que los quelatos son asimilados, estos son transferidos (translocados) casi intactos desde las raíces hacia los brotes (Baber y Lee, 1974; Hamon y col., 1995; Vassil y col., 1998).

Uno de los agentes quelantes mas usados para mejorar la fitorremediación de Pb es el ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA). El EDTA actúa acomplejando iones metálicos presentes en la solución del suelo, formando complejos solubles. Otros ácidos usados como agentes quelantes son el cítrico, málico y acético. (Volke-Sepúlveda y col., 2005).

2. JUSTIFICACIÓN

Las actividades de la industria minera pueden ocasionar graves daños ambientales, propiciando la erosión y contaminación del suelo con sales solubles de metales pesados, como As, Cd, Cu, Cr, Pb, Se, Zn y Hg. La fitorremediación de suelos contaminados con metales, es una alternativa que ofrece un bajo costo para la biorremediación de este tipo de sitios, además de que algunos metales extraídos pueden ser reciclados. Esta técnica incluye diferentes procesos tecnológicos que permiten la recuperación de suelos contaminados mediante el cultivo de plantas, por lo cual es necesario conocer la eficiencia de cada especie para acumular metales en sus tejidos y su resistencia a diferentes concentraciones de contaminantes, así como las condiciones necesarias para el cultivo y desarrollo de las especies de plantas que favorezcan la biorremediación de un sitio contaminado.

Con el desarrollo de este proyecto se pretende generar información científica que fundamente la aplicación de la fitorremediación en suelos contaminados con metales, para lo cual se llevará a cabo un muestreo de plantas que crecen en sitios contaminados y se evaluará su capacidad para acumular plomo, en un sistema modelo en condiciones *in vitro*, utilizando ácido EDTA como agente quelante. De esta manera se seleccionará al menos una especie con capacidad para acumular altas concentraciones de plomo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar la tolerancia y acumulación de plomo por diferentes especies vegetales, en un sistema *in vitro*, para la selección de plantas con potencial para la fitorremediación de suelos.

3.2. Objetivos particulares

- Recolectar especies vegetales que crecen en sitios contaminados con metales, y establecer las condiciones específicas para su germinación *in vitro*.
- Establecer las condiciones específicas para el análisis de plomo en tejidos vegetales (raíz, hojas y tallo)
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de un agente quelante (EDTA) en el crecimiento de las plantas en estudio, en un sistema *in vitro*.
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de plomo sobre el crecimiento, tolerancia y capacidad de acumulación de las plantas en estudio, en un sistema *in vitro*.
- Seleccionar la(s) especie(s) vegetal(es) más adecuada(s) para la fitorremediación de suelos contaminados con plomo, con base en su crecimiento y capacidad de acumulación en tejidos.

4. MÉTODOS Y MATERIALES

4.1. Sitios de muestreo

Las semillas de las especies en estudio, fueron recolectadas en dos sitios mineros del Estado de Guanajuato: Jesús María y Valenciana (Figura 2). A continuación se hace una breve descripción de ambos sitios.

- **Jesús María.** Forma parte de la veta de La Luz, se ubica aproximadamente a 8 Km al noroeste de la ciudad de Guanajuato. La importancia ambiental del sitio radica en que los jales presentes se encuentran dentro de los más viejos de la región y su volumen se estima en 1 millón de toneladas (Carrillo-Chávez y col., 2003).
- **Valenciana.** La mina de Valenciana es quizá la más famosa de todas las minas de Guanajuato. Su explotación comenzó alrededor del año 1600. Los jales de la mina fueron acumulados en una colina al norte de la ciudad de Guanajuato y su volumen es alrededor de 20 millones de toneladas, cubriendo 0.5 km² (Carrillo-Chávez y col., 2003).

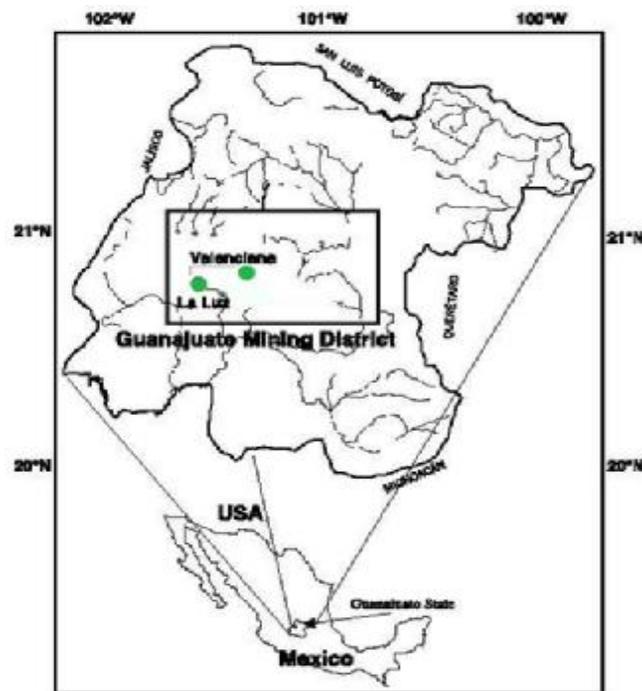


Figura 2. Localización de los sitios de muestreo en el Distrito minero de Guanajuato.

4.2. Recolección de semillas

En los sitios de muestreo, se recolectaron semillas de especies de plantas nativas, con base en los siguientes criterios:

- a) Plantas que se encuentran presentes en suelo contaminado o que crecen lo mas cercano posible a las presas o pilas de jales.
- b) Plantas maduras.
- c) Especies dominantes en la zona contaminada.
- d) Plantas con raíces abundantes, profundas y ramificadas, así como con una rizósfera extendida.

Las semillas recolectadas en los sitios de estudio, se secaron a temperatura ambiente y se almacenaron en bolsas de papel a temperatura ambiente hasta que se utilizaron para la propagación de plántulas *in vitro*. Las especies que se seleccionaron para realizar los estudios *in vitro* fueron: *Dodonea viscosa* Jacq, *Heteroteca inuloides* Cass, *Senecio Salignus* DC y *Acacia farnesiana* Willd. Dichas especies se seleccionaron para el presente estudio debido a la frecuencia con que se encontraron en los sitios de estudio y por pertenecer a familias reportadas como hiperacumuladoras. Cada especie se describe con mayor detalle en la Sección 5.1

4.3. Pretratamiento y germinación de semillas en condiciones *in vitro*

La escarificación de semillas de testa muy dura, como en el caso de *Acacia farnesiana* (huizache) y *Dodonea viscosa* (capuixtle), consistió en retirar de forma manual, un pequeño fragmento de la testa para que una parte del embrión quede expuesta, para así aprovechar al máximo su capacidad germinativa (Willd, 1806). De esta manera se induce una germinación más rápida de este tipo de semillas, cuya dura testa puede retrasar la germinación.

Antes de su germinación en condiciones *in vitro*, las semillas de cada especie deben desinfestarse. Para su desinfestación, las semillas se lavaron con detergente en polvo (2% de detergente en 100 ml de agua) y se enjugaron con agua corriente de la llave. Posteriormente, éstas se colocan en una solución de etanol al 70% (20 - 30 seg.), se enjuagan con agua desionizada estéril y se colocan en una solución al 10% (p/v) de hipoclorito de sodio comercial (20 - 30 min). Las semillas tratadas se enjuagan 3 o 4 veces más con agua desionizada estéril. En la Tabla 1 se muestran las condiciones particulares para cada especie.

Tabla 1. Condiciones de desinfestación establecidas para cada especie en estudio

Especie	Escarificación	Alcohol	Cloro
<i>Acacia farnesiana</i>	Û	30 seg.	30 min.
<i>Dodonea viscosa</i>	Û		
<i>Heteroteca inuloides</i>	û	20 seg.	20 min.
<i>Senecio salignus</i>	û		

Para inducir la germinación *in vitro*, las semillas desinfestadas se colocan en tubos de ensaye con medio basal Murashige y Skoog (MS) con 3% de sacarosa a pH 5.7 (Tabla 2).

Tabla 2. Composición del medio basal Murashige y Skoog

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

4.4. Efecto de la concentración de EDTA en el crecimiento

Las semillas desinfectadas se colocaron en tubos de (50 ml) con medio MS y se mantuvieron en la oscuridad hasta su germinación (Wang y col., 2004). Posteriormente, las plántulas se transfirieron a tubos con medio MS, 3% sacarosa y diferentes concentraciones de EDTA (0, 1, 2.5 y 5 mM). Las plántulas se mantuvieron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo artificial de 16 h a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante por 4 semanas.

El efecto de la concentración de EDTA en el crecimiento de las plantas, se evaluó a través de las siguientes variables: peso fresco, elongación de raíces y elongación de tallos. Estas variables se cuantificaron al tiempo final del estudio (5 semanas). Los resultados presentados corresponden a los promedios de 4 repeticiones para *H. inuloides* y 5 para *S. salignus*. Debido a que en el momento de evaluar las concentraciones de EDTA solo se contaba con semillas de estas dos especies.

4.5. Efecto de la concentración de plomo en el crecimiento y acumulación

De las semillas colectadas, se seleccionaron cuatro especies para estudiar el efecto de la concentración de plomo en el crecimiento y la acumulación del metal en tejidos. Como se mencionó, antes de su siembra en el sistema *in vitro*, las semillas de cada especie se escarificaron, lavaron y desinfectaron en las condiciones establecidas para cada una de ellas.

Las semillas de cada especie se germinaron en tubos (50 ml) o en cajas Magenta (Sigma) con medio basal MS, adicionado con 3% de sacarosa y diferentes concentraciones de plomo (0, 100, 250 y 500 mg/L), en forma de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Las semillas se mantuvieron en la oscuridad hasta su germinación; después de la germinación las plántulas permanecieron en una cámara de crecimiento durante 5 semanas con un fotoperiodo de 16 h a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Cada tratamiento fue evaluado en 5 - 10 plantas y los resultados presentados corresponden al promedio \pm la desviación estándar de 5 - 10 repeticiones.

Para determinar el efecto de la concentración de Pb en el crecimiento de las plantas en estudio, al cabo de 5 semanas de incubación, se cuantificó el peso fresco y seco (40°C , 48 h) de las plantas, así como la elongación de sus raíces y tallos. Una vez que se registró el peso seco de las raíces y tallos de cada ejemplar, éstos se pulverizaron en un mortero, por separado, para su digestión ácida y cuantificación del contenido de plomo en los tejidos por espectrofotometría de absorción atómica (EAA)

4.6. Determinación del índice de tolerancia a plomo

El índice de tolerancia a la presencia de Pb para cada especie en estudio, se determinó relacionando la elongación de las raíces de las plantas que crecieron en el medio con plomo con las plantas que crecieron en ausencia del contaminante. El índice de tolerancia se cuantificó por medio de la siguiente ecuación (Wilkins, 1978; Deng y col., 2006):

$$IT\% = \frac{\text{*Long. raíces en medio + metal} \times 100}{\text{* Long. raíces en medio - metal}}$$

*Longitud de raíces en el medio (cm)

4.7. Efecto del ácido indolacético en el crecimiento y acumulación de Pb por *A. farnesiana*

De las semillas colectadas, se seleccionó *A. farnesiana* para estudiar el efecto de la concentración de un regulador de crecimiento vegetal, el ácido-3-indolacético (AIA), en el crecimiento y la acumulación de plomo en tejidos. Antes de su siembra en el sistema *in vitro*, las semillas se escarificaron, lavaron y desinfectaron.

Las semillas se pusieron a germinar en cajas Magenta (Sigma) con medio basal MS adicionado con sacarosa (3%), plomo (100mg/L, adicionado como $Pb(NO_3)_2$) y diferentes concentraciones de AIA (1, 10 y 100 μ M). Las semillas se mantuvieron en la oscuridad hasta su germinación, y posteriormente las plántulas permanecieron en una cámara de crecimiento durante 5 semanas con un fotoperiodo de 16 h a $25 \pm 2^\circ C$. Cada tratamiento fue evaluado con 8 plantas y los resultados presentados corresponden al promedio \pm la desviación estándar de 8 repeticiones.

Para determinar el efecto del AIA en el crecimiento de las plantas en estudio, al cabo de 5 semanas de incubación, se cuantificó el peso fresco y seco ($40^\circ C$, 48 h) de las plantas, así como la elongación de sus raíces y tallos. Una vez que se registró el peso seco de las raíces y tallos de cada ejemplar, éstos se pulverizaron en un mortero, por separado, para su digestión ácida y cuantificación del contenido de plomo en los tejidos por EAA.

4.8. Análisis y cuantificación de plomo

El contenido total de Pb en las muestras de plantas se cuantificó, después de su digestión ácida por microondas. Para la digestión de las muestras se utilizó un horno de microondas CEM (MDS 2000), operado a 60psi y $160^\circ C \pm 5^\circ C$, durante 20 min, la cuantificación de Pb fue medida por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) en un espectrófotometro Varian (Spectra AA 200), por el método de flama.

4.8.1. Digestión ácida por microondas

Con el propósito de evaluar las mejores condiciones para evitar la interferencia química, debida al contenido de materia orgánica, durante el análisis cuantitativo del Pb, se probaron diferentes mezclas para la extracción ácida del plomo. La digestión de las muestras pulverizadas se llevó a cabo de acuerdo al método EPA-3051A. Para lo anterior, se pesaron 100mg de biomasa vegetal seca, la cual se adicionó con diferentes mezclas de digestión y se trató de acuerdo a las condiciones descritas en la Tabla 2. Para evaluar la eficiencia de cada condición, se utilizaron tallos de un arbusto de *A. farnesiana* crecido sobre residuos mineros en la mina Valenciana.

Una vez realizada la digestión, cada muestra se dejó enfriar, se filtró con membranas de 0.45 μm (GN-6 *Metrice*) y se aforó a 25 mL con agua desionizada ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) de un equipo *Milli-Q*.

Tabla 3. Condiciones evaluadas para la digestión ácida de muestras de *A. farnesiana*.

Mezcla de digestión	Condiciones
HNO ₃	Predigestión, 0.5 h
HNO ₃	Predigestión, 12 h
HNO ₃	Doble digestión
HNO ₃ -H ₂ O ₂ (5:2)	Doble digestión
HNO ₃ -H ₂ O ₂ (5:2)	Predigestión, 12 h
HNO ₃ -HClO ₄ (4:1)	Predigestión, 0.5 h
HNO ₃ -H ₂ O ₂ -HClO ₄ (6:0.5:1)	Predigestión, 0.5 h

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

La cuantificación de plomo por EAA se realizó en muestras líquidas obtenidas de la digestión ácida. El análisis se llevó a cabo de acuerdo al método EPA-7000, mediante horno de grafito (HG) y por flama (FA), siguiendo las condiciones que indica el manual del equipo para la medición de plomo (Tabla 3). Para el análisis de muestras por flama, se utilizó una longitud de onda de 217 nm, con una mezcla de gas de aire-acetileno (L/min) y una abertura del quemador de 1.0 mm.

Tabla 4. Programa de operación para el horno de grafito establecido por el manual de uso del EAA (*Varian*)

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)	Flujo de gas (L/min)
1	85	4	3.0
2	95	40	3.0
3	120	10	3.0
4	400	5	3.0
5	400	1	3.0
6	400	2	0
7	2100	1	0
8	2100	2	0
9	2100	2	3.0

Las curvas patrón para la cuantificación de Pb se prepararon en un rango de 2 a 10 mg/L, con una solución estándar de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de plomo (estándar grado absorción atómica, *J.T. Baker*), utilizando agua desionizada (*Milli-Q*).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Especies en estudio

De las semillas recolectadas se seleccionaron cuatro especies para realizar los ensayos de germinación, acumulación y crecimiento en presencia de plomo: *Acacia farnesiana* Willd, *Dodonea viscosa* Jacq., *Heterotheca inuloides* Cass y *Senecio salignus* DC. Estas cuatro especies pertenecen a familias para las cuales se ha reportado un gran número de géneros de plantas hiperacumuladoras (Prasad y Freitas 2003). En la Tabla 5 se presentan las características más importantes de cada especie.

Tabla 5. Características más importantes de las especies en estudio.

Género/Especie	Familia	Nombre común	Origen	Características
<i>Acacia farnesiana</i> Willd	<i>Fabaceae</i> (Leguminosae)	Huizache	Incierto	Hierbas, arbustos y árboles. Se encuentran en áreas con selva baja caducifolia y matorral espinoso
<i>Dodonea viscosa</i> Jacq.	<i>Sapindaceae</i>	Ocotillo, Capuixtle	Australia, N. Zelanda y America	Arbusto de 1 a 3 metros de alto, de follaje viscoso, se localiza en regiones secas
<i>Senecio salignus</i> DC.	<i>Asteraceae</i> (Compositae)	Higuerilla, Jarilla	México	Arbusto asociado con bosques de pino y roble, común en lugares perturbados
<i>Heterotheca inuloides</i> Cass.	<i>Asteraceae</i>	Árnica	México	Planta herbácea perenne de 50 a 70 cm. Puede encontrarse en bosques de pino-encino y pastizales

5.2. Selección de condiciones para cultivos in vitro

La mejor manera de escarificar las semillas con testa dura (*A. farnesiana* y *D. viscosa*) fue la forma manual, que consiste en cortar o perforar un fragmento de la testa de la semilla. Uno de los métodos químicos utilizados fue el remojo de la semilla en ácido sulfúrico concentrado durante 30 y 45 minutos; sin embargo, éste no fue eficiente para las semillas de huizache. Para las otras dos especies, no fue necesario ningún tipo de escarificación.

Para la desinfección de las semillas, el mejor método resultó el lavado con detergente en polvo durante 20 min para *H. inuloides* y *S. salignus*, y durante 30 min para *A. farnesiana* y *D. viscosa*. Posteriormente, las semillas se colocan en una solución de etanol al 70% durante 20 s para *H. inuloides* y *S. salignus* y por 30 s para *A. farnesiana* y *D. viscosa*. Se enjuagan con agua desionizada estéril y se colocan en una solución al 10% (p/v) de hipoclorito de sodio con dos gotas de Tween 20, durante 30 min, para finalmente enjuagar varias veces con agua desionizada estéril.

5.3. Análisis y cuantificación de plomo en plantas

5.3.1. Digestión de muestras vegetales

Con el objeto de mejorar y estandarizar la digestión de muestras vegetales, así como para disminuir interferencias asociadas al contenido de materia orgánica de las mismas, que impiden la correcta medición de plomo por EEA, se evaluaron diferentes condiciones para la digestión ácida por microondas. Algunos autores recomiendan el uso de 0.4 - 2.0 ml de HNO_3 para digerir 200 mg de muestra (Kotz, y col., 1972; Kotz y col., 1979; Stoeppler y col., 1979). Sin embargo, tanto las mezclas de agentes de extracción como las cantidades de muestra a digerir varían significativamente entre las referencias revisadas. En la Figura 3 se muestra la eficiencia de extracción de plomo obtenida para cada condición de digestión utilizada, las cuales se describen en la Tabla 2 (Métodos y Materiales).

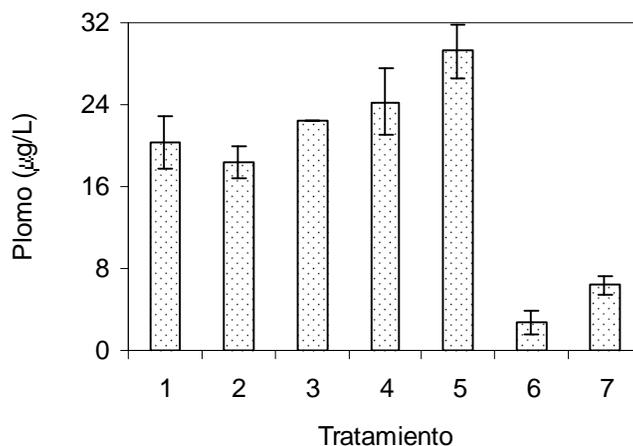


Figura 3. Concentraciones de plomo obtenidas por EAA-HG, en función de las condiciones de digestión de muestras de tallos de *A. farnesiana*

A partir de estos resultados, se determinó que la mezcla más adecuada para la digestión ácida y la extracción del plomo contenido en muestras vegetales fue HNO_3 69% con H_2O_2 30% (5:2 v/v). El empleo de HNO_3 acelera la oxidación de materia orgánica y la adición de H_2O_2 incrementa la velocidad del proceso (Ndung'u y col., 2004).

Adicionalmente, se probó el efecto de diferentes tiempos de predigestión, encontrando que el tratamiento más eficiente fue adicionando la mezcla de ácido nítrico y peróxido 16 horas antes de la digestión en microondas (predigestión). Con base en los resultados obtenidos de este estudio, se seleccionaron las mejores condiciones de digestión, de manera que todas las digestiones posteriores se realizaron en dichas condiciones. Los resultados cualitativos de estas pruebas se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Determinación cualitativa de la eficiencia de los tiempos de predigestión en la degradación de materia orgánica

Tiempo de predigestión (h)	Observaciones
0	Queda materia vegetal sin digerir
0.5 – 1	Se reduce el volumen de materia vegetal, pero aún quedan residuos
16 – 20	No se observan residuos de materia vegetal

5.3.2. Análisis de plomo por EAA

El contenido de plomo en tejido vegetal (tallo y raíz) se cuantificó, después de su digestión, por EAA por el método de flama, ya que la concentración de Pb en algunas muestras superaron el límite señalado por el horno de grafito (HG), además que el empleo de este método evita interferencias químicas durante la medición. Las muestras con bajas concentraciones de plomo, se analizaron con el empleo de EAA-HG.

5.4. Efecto del EDTA en el crecimiento

Se evaluó el crecimiento *in vitro* de dos de las especies en estudio (*H. inuloides* y *S. salignus*), en un medio con diferentes concentraciones de EDTA. Se observó un efecto del EDTA sobre todas las variables evaluadas, tanto para *H. inuloides* como para *S. salignus*, siendo ésta última la especie más sensible al aumento en la concentración del EDTA (Figuras 4 a 6).

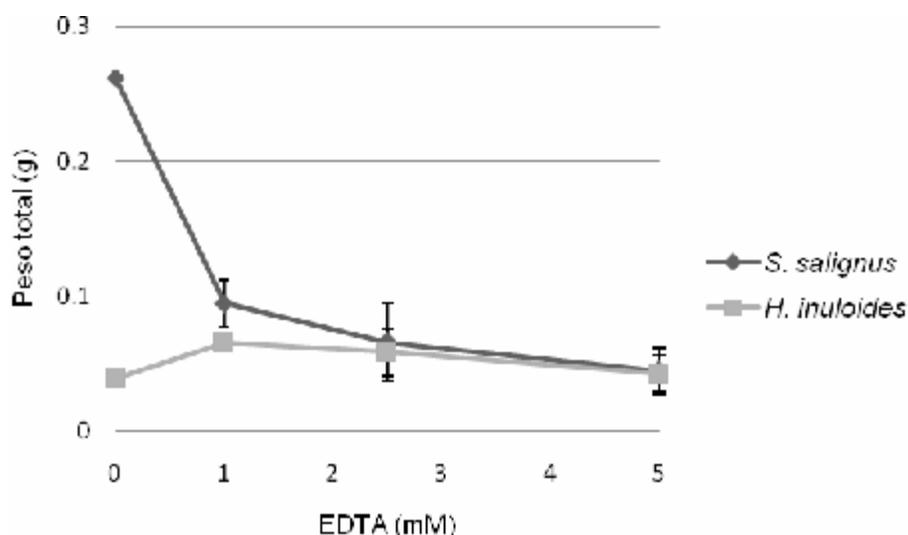


Figura 4. Efecto de la concentración de EDTA en el peso seco total de plántulas de *S. salignus* y *H. inuloides* después de 5 semanas de incubación. Los valores representan la media (\pm DS) de 4 repeticiones para *H. inuloides* y 5 para *S. salignus*

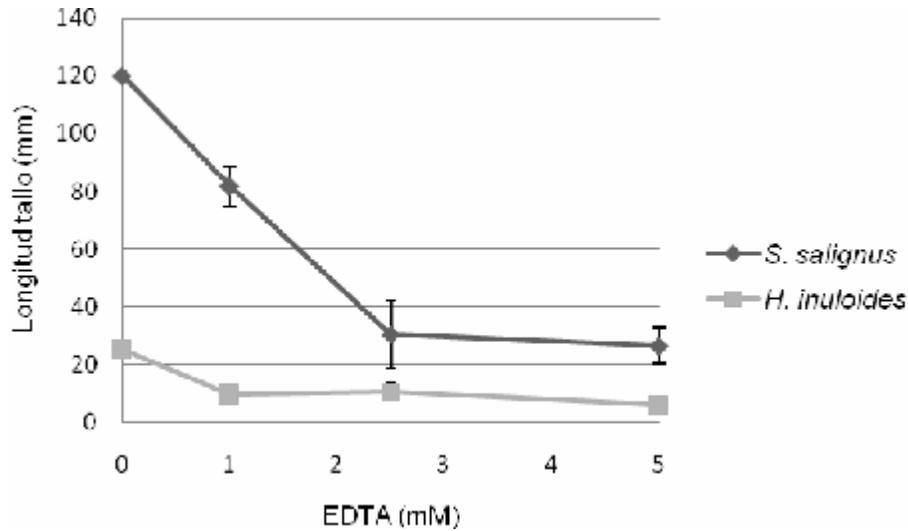


Figura 5. Efecto de la concentración de EDTA en la longitud total de tallos de plántulas de *S. salignus* y *H. inuloides* después de 5 semanas de incubación. Los valores representan la media (\pm DS) de 4 repeticiones para *H. inuloides* y 5 para *S. salignus*

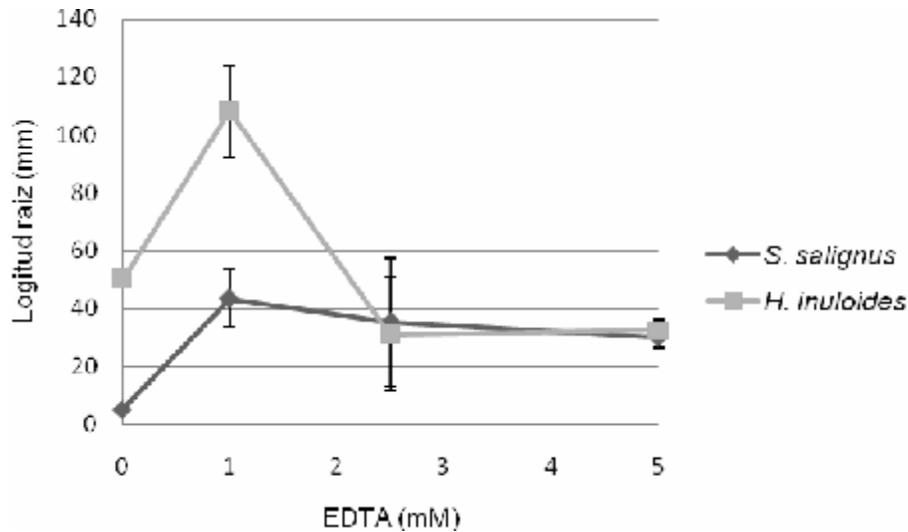


Figura 6. Efecto de la concentración de EDTA en la longitud total de raíz de plántulas de *S. salignus* y *H. inuloides* después de 5 semanas de incubación. Los valores representan la media (\pm DS) de 4 repeticiones para *H. inuloides* y 5 para *S. salignus*

Como se observa en las Figuras, el aumento en la concentración de EDTA tuvo un efecto negativo en el crecimiento de ambas especies, evaluado a través del peso seco total y la elongación de tallos y raíces. Este efecto se observó de manera más marcada para *S. salignus*, en donde se registró una disminución de más de 60% en el peso total de los individuos crecidos

con EDTA, con respecto al control sin el ácido. Para *H. inuloides*, el efecto de la concentración de EDTA en el peso total y elongación de raíces no presentó efectos negativos, solo se observó una disminución (~50%) en la longitud de tallos al aumentar la concentración de EDTA.

Aunque el EDTA es efectivo para facilitar la extracción de metales, en general se ha observado que, la aplicación de más de 1 g/kg (2.7 mM), de EDTA se vuelve ineficiente, ya que las concentraciones de plomo en los tejidos vegetales no aumentan significativamente y se corre el riesgo de que los metales lixiviados aumenten, y las plantas mueran (Schmidt, 2003). Albasel y Cottenie, (1985), encontraron que después de adicionar 1g/kg de EDTA a un suelo con 110 mg Pb kg, las plantas de *Lolium perenne* detuvieron su crecimiento y murieron.

Chen y col. (2004), compararon el efecto de diferentes concentraciones de EDTA (2.5 a 5 mM) en 10 especies de plantas, 4 monocotiledóneas y 6 dicotiledóneas, encontrando que las dicotiledóneas son más sensibles al aumento en la concentración de EDTA, ya que presentaron síntomas visibles de toxicidad, principalmente en las hojas, como clorosis, enrollamiento de las hojas y necrosis, senescencia de los brotes y finalmente las plantas murieron.

De esta manera, los trabajos mencionados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio, confirmando el efecto tóxico en las plantas de concentraciones de EDTA mayores a 1mM. Las dos especies estudiadas pertenecen al grupo de las dicotiledóneas y, en ambos casos, se presentaron síntomas visibles de los efectos tóxicos, siendo más marcados para *S. salignus* que para *H. inuloides*.

5.5. Efecto del plomo en la germinación y crecimiento

Varios estudios han mostrado que la cubierta de la semilla de una planta es una de las mayores barreras al paso de metales, previniendo así la contaminación del embrión. El efecto de los metales en la germinación de semillas de diferentes plantas depende de la estructura de la semilla, particularmente de la cubierta, ya que ésta tiene un amplio rango de formas anatómicas que no existen en otro órgano o tejido de la planta (Wierzvicka y Obidzinska 1998; Munzuruglu y Geckil, 2000).

La Figura 7 ilustra el efecto de la concentración de plomo en la germinación de semillas de *H. inuloides*, *S. salignus*, *A. farnesiana* y *D. viscosa*. Se observó que las semillas de las cuatro especies germinaron, pero solo *A. farnesiana* y *D. viscosa* tuvieron una germinación del 99%, además de que continuaron creciendo en presencia de plomo sin efectos tóxicos visibles; todas las plántulas de *A. farnesiana* y *D. viscosa* permanecieron en óptimas condiciones hasta el tiempo final del experimento (5 semanas).

H. inuloides, y *S. salignus* mostraron mayor sensibilidad a la exposición de plomo (Figura 7), aunque puede observarse que el bajo índice de germinación no se debe a la presencia de plomo, si no probablemente a la inmadurez de las semillas colectadas. En ambos casos, se registró un bajo porcentaje de germinación, menor al 20%, y la mayoría de las plántulas crecidas en presencia de plomo murieron a la semana de su germinación. Este resultado

demuestra que la inhibición en el crecimiento de estas dos especies fue efecto de la presencia de plomo en el medio.

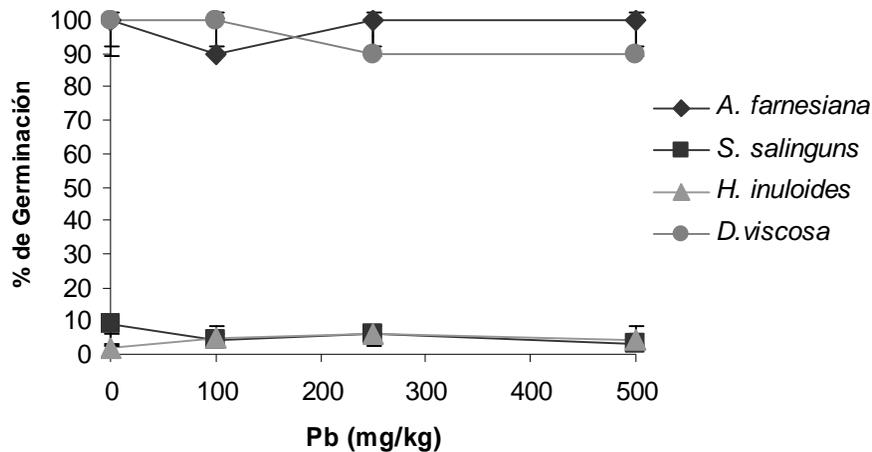


Figura 7. Efecto de la concentración de Pb en la germinación de *A. farnesiana*, *D. viscosa*, *H. inuloides* y *S. salignus* después de una semana de incubación. Los valores representan la media (\pm DS) de 5 replicas

Lane y Martin (1977) demostraron que con concentraciones de plomo entre 1.66 y 3.31 g/L las semillas de rábano germinaron sin problemas ya que el plomo no puede penetrar la cubierta de dichas semillas. Lo anterior muestra que la cubierta de una semilla es la primera barrera que evita la inhibición en su germinación. Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, el porcentaje de germinación varía en función de la especie, observándose que las semillas de ciertos grupos pueden germinar aún en altas concentraciones de contaminantes debido a sus características genotípicas.

5.5.1. Efecto del plomo en el crecimiento de *A. farnesiana* y *D. Viscosa*

De acuerdo con Alloway (1990), los mecanismos de fitotoxicidad por plomo se relacionan con cambios en la permeabilidad de las membranas celulares, reacciones de grupos sulfhidrilo (-SH) con cationes y con la afinidad para reaccionar con grupos fosfato y grupos activos de ADP o ATP. Este autor afirma que la toxicidad que causa el plomo hacia una especie de planta, varía en función de su genotipo así como de las condiciones experimentales a las que éstas son sometidas.

Las Figuras 8 y 9 muestran el efecto de la concentración de plomo en la elongación de raíz y tallo de *A. farnesiana* y *D. viscosa*, respectivamente. En el caso de *A. farnesiana*, se observó un incremento en la longitud del tallo y la raíz, por efecto del plomo, aún en las concentraciones más altas. *D. viscosa* presentó una ligera disminución en la longitud de las raíces y tallos, la cual resultó estadísticamente no significativa.

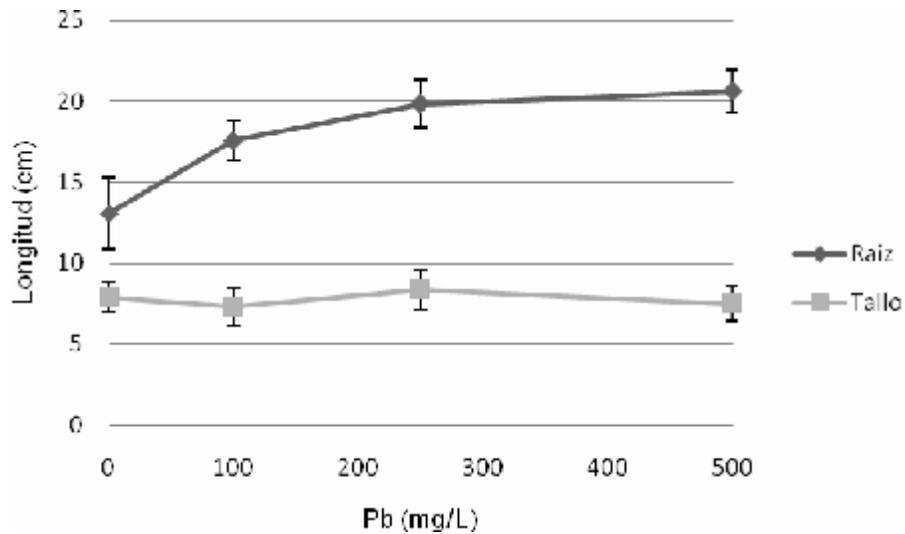


Figura 8. Efecto de la concentración de Pb en la elongación de raíces y tallos de *A. farnesiana*, después de 5 semanas de incubación. Los valores representan la media (\pm DS) de 5 replicas

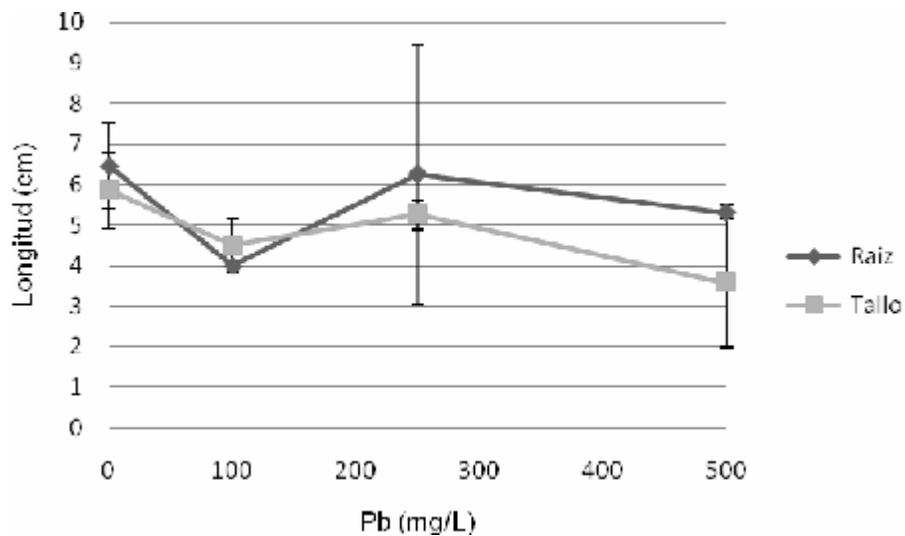


Figura 9. Efecto de la concentración de Pb en la elongación de raíces y tallos de *D. viscosa*, después de 5 semanas de incubación. Los valores representan la media (\pm DS) de 5 replicas

Xiong (1998) estudió el efecto del plomo en la germinación de semillas y crecimiento de plantas de una especie hiperacumuladora, *Brassica pekinensis* Rupr. Sus resultados mostraron que aún con altas concentraciones de plomo (1000 µg/mL), la germinación no varió significativamente con respecto al control, pero la elongación de las raíces y brotes se vio afectada reduciendo la longitud a la mitad con respecto al control sin plomo, observando mayores efectos negativos en las raíces. Se demostró que esta especie tiene capacidad para hiperacumular plomo en sus tejidos pero que es sensible a concentraciones de plomo mayores a 1000µg/mL

En contraste con los resultados de Xiong (1998), los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que *A. farnesiana* y *D. viscosa*, son especies que tienen capacidad para crecer en concentraciones de plomo soluble de hasta 500 mg/L, sin efectos significativos en la elongación de raíces y tallos en *D. viscosa*, aunque el tallo presentó una ligera disminución en la longitud al aumentar la concentración de plomo, no hubo gran diferencia con respecto al control.

5.5.2. Índice de tolerancia a plomo para *A. farnesiana* y *D. viscosa*

Baker (1987) define la tolerancia a la presencia de un contaminante como las adaptaciones que tienen ciertas especies para crecer y reproducirse en lugares fuertemente contaminados.

Xiong (1998) sugiere que la principal razón para que la longitud de la raíz sea usada como una medida para determinar la capacidad de una planta para tolerar metales, es que la raíz es más sensible a elementos tóxicos en el ambiente, debido a que es un órgano especializado en la absorción. Por tal motivo, es el primer órgano en estar sometido a la presencia de diferentes contaminantes y, por lo tanto, el primero en presentar efectos tóxicos.

La Figura 10 muestra los índices de tolerancia obtenidos para *A. farnesiana* con respecto a diferentes concentraciones de plomo, este índice puede compararse con el 100% que se obtiene a partir de las plantas control que no estuvieron expuestas a la presencia de plomo, mostrando que esta especie no solo es tolerante, si no que la presencia de concentraciones de plomo en el rango de 100 a 250 mg/L estimula la elongación de la raíz 20%, con respecto al control.

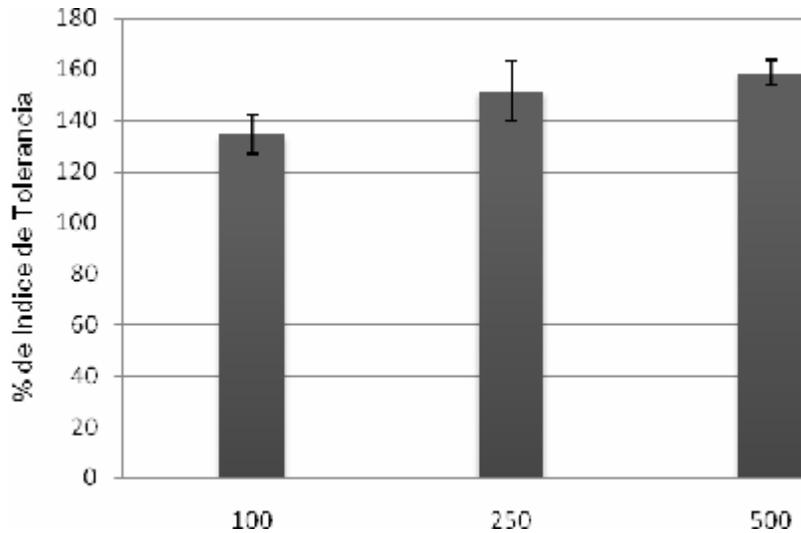


Figura 10. Índices de tolerancia a diferentes concentraciones de Pb para *A. farnesiana*. Los valores representan la media (\pm DS) de 5 replicas

En la Figura 11 se muestran los índices de Tolerancia de *D. viscosa* con respecto a las diferentes concentraciones de Pb observando que no presenta una tolerancia al contaminante del 100% con respecto al control sin embargo esto no afecto en el desarrollo de la planta ya que permanecieron vivas hasta el final del estudio

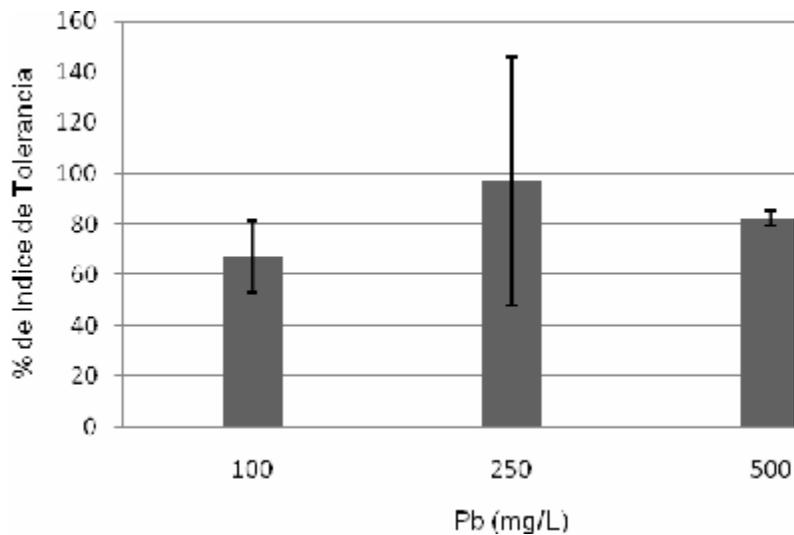


Figura 11. Índices de tolerancia a diferentes concentraciones de Pb para *D. viscosa*. Los valores representan la media (\pm DS) de 5 replicas

5.6. Capacidad de fitoacumulación de plomo por *A. farnesiana* y *D. viscosa*

La capacidad de fitoacumulación de Pb por *A. farnesiana* y *D. viscosa*, se determinó después de 5 semanas de incubación, cuantificando la concentración de Pb en el tejido vegetal después de su digestión ácida por microondas, por espectrofotometría de absorción atómica (EAA).

En la Fig. 12 se muestra la acumulación de Pb en raíces y tallos de *A. farnesiana*. Se observó que la acumulación de Pb en tejidos aumentó junto con el incremento en la concentración de Pb en el medio de cultivo, observándose cantidades superiores en raíces que en tallos, estos resultados son similares a los obtenidos por Sharma y Dubey (2005), plantean que el plomo es principalmente almacenado en el sistema radicular en comparación con las partes aéreas, ya que primero es absorbido por las raíces y posteriormente es translocado a las partes aéreas.

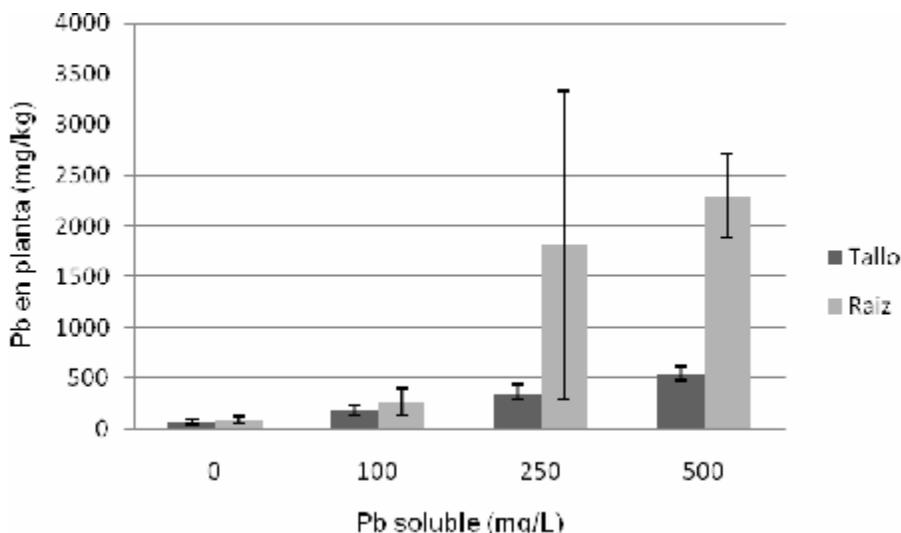


Figura 12. Acumulación de Pb en raíces y tallos de *A. farnesiana* después de 5 semanas de incubación. Los valores representan la media (\pm DS) de 5 replicas

Antosiewicz (1992), demostró que el contenido de plomo en varios órganos de una planta decrece en el siguiente orden: raíz>hojas>tallo>inflorescencias>semillas. Sin embargo, el autor deja indicar que este orden puede variar de acuerdo de la especie de planta.

En la figura 13 se observa que la acumulación de Pb en el tejido de *D. viscosa* es mayor en las raíces que en el tallo, observado que la acumulación de Pb en el tallo va en aumento al ir aumentando la concentración de Pb en el medio de cultivo, sin embargo al aumentar la concentración de Pb la acumulación de Pb disminuye en raíz.

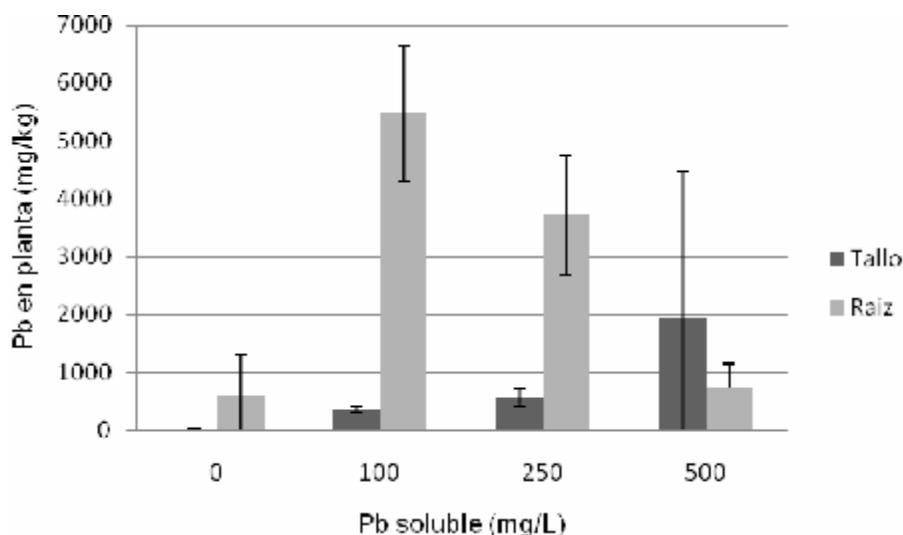


Figura 13. Acumulación de Pb en raíces y tallos de *D. viscosa* después de 5 semanas de incubación. Los valores representan la media (\pm DS) de 5 replicas

De acuerdo con Brooks (1977), una planta hiperacumuladora de plomo, es aquella capaz de almacenar en su tejido seco hasta 1000 mg/kg del metal. Por ejemplo, Brooks (1998) encontró que *Thlaspi rotundifolium* almacenó hasta 8,200 mg/kg de plomo en sus hojas y raíces, definiéndola como una especie hiperacumuladora. Begonia y col. (2005), reportaron a *Festuca arundinacea* como una especie hiperacumuladora de plomo, ya que ésta acumula hasta 2000 mg/kg de plomo total.

De acuerdo con los resultados obtenidos, *A. farnesiana* y *D. viscosa* pueden almacenar en sus tejidos hasta 5000 mg/kg de plomo, encontrando mayor concentración de plomo en raíces que en los tallos, por lo que, de acuerdo con lo reportado en la literatura, puede decirse que ambas son especies con potencial para su uso en fitorremediación.

5.7. Efecto del AIA en el crecimiento y acumulación de Pb por *A. farnesiana*

El ácido indolacético (AIA) es una auxina natural implicada en el desarrollo del embrión, formación de raíces laterales, tropismo, dominancia apical, vascularización y otros procesos durante el desarrollo de las plantas (Davies, 1995). Este regulador de crecimiento vegetal, es generalmente usado para almacenar y/o transportar proteínas o como intermediario catabólico en las plantas (Bartel, 1997; Bartel y col., 2001; Lyung y col., 2002 (Cohen y Bandurski, 1978: Ostin y col., 1995; Normanly 1997) ya que en altas concentraciones, el AIA puede inhibir la elongación de la raíz (Bartel y Fink 1995; Davies y col., 1999; Lasswell y col., 2000; LeClere y col., 2002)

En la Figura 14 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de AIA en el peso fresco total de la planta. Puede verse que aunque hubo un ligero aumento en el peso total de la planta por efecto de la presencia de EDTA (0.5 mM) y de AIA (1 μ M), éste no fue significativo.

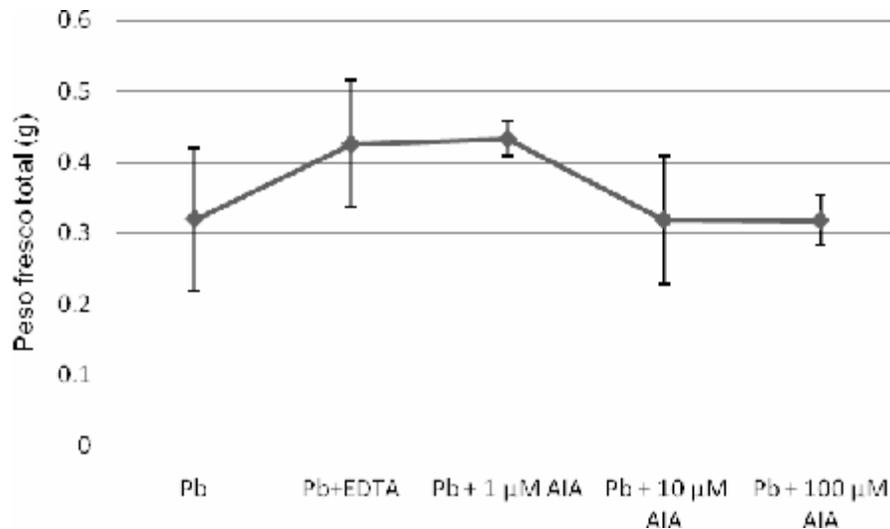


Figura 14. Efecto de la concentración de AIA en el peso total de *A. farnesiana* después de 5 semanas de incubación. Pb:plomo (100 mg/L); Pb+EDTA (0.5 mM); AIA: ácido indolacético. Los valores representan la media (\pm DS) de 5 replicas

Con respecto a la longitud de tallos y raíces, se observó que al aumentar la concentración de AIA en el medio de cultivo ($\geq 10 \mu$ M), ambas variables disminuyeron con respecto a los tratamientos con Pb, Pb + EDTA y Pb + 1 μ M de AIA (Figura 15).

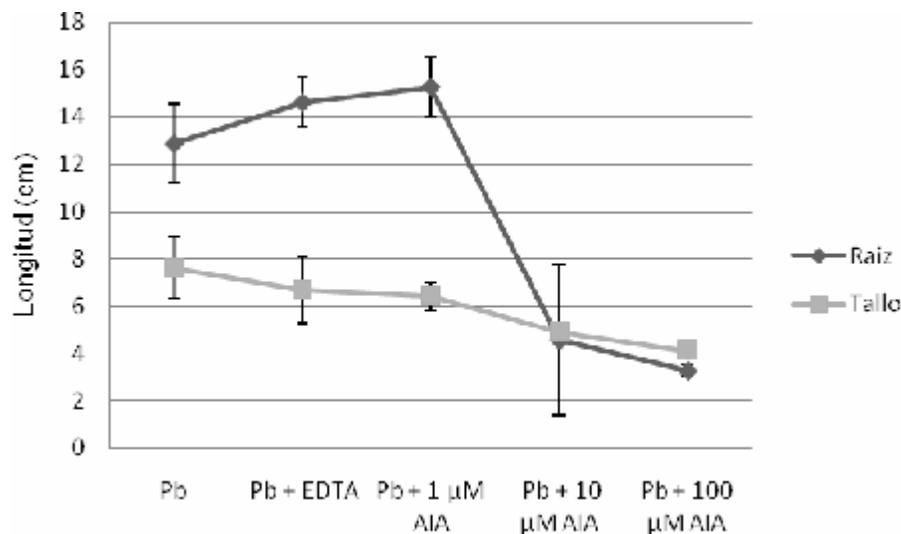


Figura 15 Efecto de la concentración de AIA en la elongación de raíz y tallo de *A. farnesiana* después de 5 semanas de incubación. Pb:plomo (100 mg/L); Pb+EDTA (0.5 mM); AIA: ácido indolacético. Los valores representan la media (\pm DS) de 5 replicas

En la Fig. 16 se muestra la acumulación de Pb en raíces y tallos de *A. farnesiana* por efecto de la presencia de EDTA y AIA en el medio. Se observó que la acumulación de Pb en tejidos no aumentó junto con el incremento en la concentración de AIA en el medio de cultivo, observándose cantidades superiores en raíces que en tallos. El EDTA mejoró significativamente la acumulación de Pb por *A. farnesiana*, con respecto al control sin aditivos.

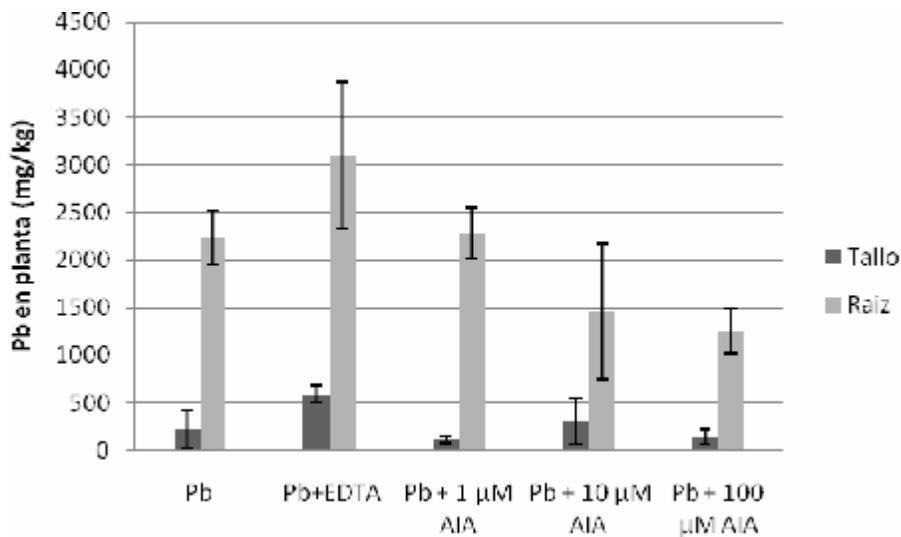


Figura 16. Efecto de la concentración de EDTA y AIA en la acumulación de Pb en tallos y raíces de *A. farnesiana* después de 5 semanas de incubación. Los valores representan la media (\pm DS) de 5 replicas

López y col. 2005 estudiaron el efecto del AIA, como un agente quelante, para la acumulación de Pb por *Medicago sativa* (alfalfa). Este grupo encontró que las concentraciones de Pb en las raíces y el tallo de la planta aumentaron junto con el incremento en la concentración de AIA, sin embargo, dicho aumento no fue significativo para las hojas, ya que compararon sus resultados con plantas tratadas con EDTA que, como se ha mencionado, es un agente quelante que favorece la acumulación de Pb en las plantas.

En el caso del presente estudio, la presencia de AIA no mejoró la acumulación de Pb por *A. farnesiana*, con respecto a las plantas crecidas en medio adicionado con EDTA. Como puede verse, la mayor acumulación de plomo se obtuvo en presencia de EDTA, y no se observaron diferencias significativas en la acumulación de plomo entre las plantas control y las plantas con AIA en concentraciones de 1 y 10 μ M. De acuerdo con los resultados mostrados, el AIA adicionado en altas concentraciones (100 μ M), resultó inhibitorio para el crecimiento (peso total y elongación de tallos y raíces) y acumulación de Pb por *A. farnesiana*.

6. CONCLUSIONES

Se colectaron semillas de cuatro especies vegetales (*A. farnesiana*, *D. viscosa*, *H. inuloides* y *S. salignus*) que crecen en sitios contaminados con residuos mineros en el Estado de Guanajuato, para las cuales se establecieron las condiciones particulares de germinación y cultivo *in vitro*.

Se estableció que las mejores condiciones para la digestión ácida de muestras vegetales, es el empleo de una mezcla de digestión $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ (5:2), con una predigestión de 16 h.

Se determinó que concentraciones de EDTA mayores a 1 mM provocan un efecto negativo en el crecimiento de *S. salignus* y *H. inuloides*, por lo que es recomendable utilizar concentraciones menores para favorecer el crecimiento y la acumulación de plomo. Asimismo, se encontró que para dichas especies, la presencia de Pb en el medio de cultivo, aún en bajas concentraciones (100 mg/L), provocó efectos negativos en el crecimiento.

Se encontró que *A. farnesiana* y *D. viscosa* son especies que toleran concentraciones de Pb de hasta 500 mg/L, y que ambas tienen capacidad para acumular el metal en sus tejidos en concentraciones mayores a 1000 ppm en presencia de EDTA (1 mM). Por lo anterior, *A. farnesiana* y *D. viscosa* pueden considerarse especies con potencial para la fitorremediación de sitios contaminados con concentraciones totales de plomo ≤ 500 mg/L.

Aunque la adición de ácido indolacético (1 - 10 μM) incrementó ligeramente el crecimiento (peso total) de *A. farnesiana*, no se observó un efecto significativo en la acumulación de plomo con respecto a la acumulación en presencia de EDTA.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alloway, B.J. 1990. Heavy metals in soils. John Wiley and Sons, Inc. New York pp: 7-28, 25-26, 120-121.
- Araujo, G. C., Gonzalez, M., Ferreira, A., Nogueira, A. R., Nobrega, J. 2002 Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials *Spectrochimica Acta Part B* 57 2121–2132
- Atıcı, Ö., Agar, G., Battal, P. 2003 Interaction between endogenous plant hormones and α -amylase in germinating chickpea seeds under cadmium exposure. *Fresenius Environmental Bulletin* 12: 781-785,
- Baker, A.J.M. y Brooks, R.R. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, 1: 81-126.
- Baker, A.J.M., Walker, P.L. 1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: Shaw, A.J. (Ed.), *Heavy Metal Tolerance in Plants*. CRC Press, Boca Raton, pp. 155-178.
- Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Hajar, A.S.M. 1994. Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl (*Brassicaceae*). *New Phytologist* 127, 61-68
- Banuelos, G.S., Ajwa H.A., Mackey B., Wu L., Cook C., Akohoue S., and Zambrzuski S., 1997. Selenium-induced growth reduction in Brassica landraces considered for phytoremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 36, pp. 282-287
- Bartel, B. 1997 Auxin biosynthesis *Annual Review Plant Physiology, Plant Molecular Biology* 48: 51-66.
- Bartel, B. y Fink, G.R. 1995 ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science* 268 1745-1748
- Bartel, B., LeClere, S., Magidin, M. and Zolmsn, B.K. 2001 Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid β -oxidation. *Journal Plant Growth Regulator* 20 198-216
- Blaylock, M.J., and Huang, J.W. 2000 Phytoextraction of metals, In: I. Raskin and B.D. Ensley (Ed.) *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*, John Wiley and Sons, Inc, Toronto, Canada, p. 303.
- Bech, J., Poschenrieder, C., Barceló, J., Lansac, A. 2002 Plants from Mine Spoils in the South America Areas as Potential Sources of Germoplasma for Phytoremediation Technologies. *Act Biotechnology*. 22: 1-2, 5-11
- Bowen, H. J 1979 Environmental chemistry of the elements. Academic Press, New York 333p

- Carrillo-Chávez, A., Morton-Bermea, E., González-Partida, Rivas-Solórzano, G., Oesler, V., García-Meza, E., Hernández, P., Cienfuegos. E. 2003 Environmental geochemistry of the Guanajuato Mining District, Mexico. *Ore Geology Reviews*, 23: 277-297.
- Chaney, R.L., Ryan A.J. 1994 Risk based standars for Arsenic, Lead, and Cadmium in urban soils. Dechema, Frankfurt, Germany. 130p
- Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S. y Baker, A.J.M. 1997 Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 8: 279-284.
- Chen, Y., Li X., Shen, Z., 2004 Leaching and uptake of heavy metals bye ten different species of plants during an EDTA-assisted phytoextracion process. *Chemosphere* 57 187-196.
- Claire, L.C., Adriano D.C., Sajwan K. S., Abel S.L., Thoma D.P., and Driver J.T. 1991. Effects of selected trace metals on germinating seeds of six plant species. *Water, Air, and Soil Pollution*, 59, pp. 231-240
- Cohen, J.D. y Bandurski R.S. 1978. The bound auxin: protection of indole-3-acetic acid from peroxidase-catalyzed oxidation. *Planta* 139 203-208
- Cooper, E.M., Sims, S.D., Cunningham, J. W., Huang, W. R., Berti. 1999 Chelate-assisted phytoextraction of lead from contaminates soils. *Journal Environmental Quality* 28: 1709-1719
- Dahmani-M, H., Oort van, F., Gélie, B. y Balabane, M. 2000 Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution*, 109 231-238
- Davies, B.E. 1995 Lead and other heavy metals in urban areas and consequences for the health their inhabitants. In: Majumdar S.K., Miller E.W., Brenner F.J. (eds), *Environmental Contaminants, Ecosystems and Human Health*, pp.287-307. The Pennsylvania Academic of Science, Easton PA. USA
- Davies, P.J. 1995 Introduction. In *Plant Hormones* (Davies, P.J. ed.).Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp.1-38
- Deng, H., Ye, H.Z., Wong, H.M. 2006 Lead and zinc accumulation and tolerance in populations of six wetland plants *Enviromental Pollution* 141 69-80
- Eapen, S. y D'Souza, S.F. 2005 Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology Advances*, 23 97-114
- Fernandes, J.C., y Henriques, F.S. 1991. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants, *The Botanical Review*, 57, pp. 246-273
- Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C. 1978. The physiology of metal toxicity on plants. *Annual Review Plant Physiology* 29: 511-566.

- Freitas, H., Prasad, M.N.V. y Pratas J. 2004 Plant community tolerant to trace elements growing on the degraded soils of São Domingos mine in the south east of Portugal: environmental implications. *Environmental International*, 30 65-72
- Godzik, B., 1993 Heavy metal contents in plants from zinc dumps and reference area. *Pol. Bot. Stud.* 5 :113-132
- Gutiérrez, M. 2003. Minería Unión de Grupos Ambientalistas (UGAM). Disponible en Internet en: <http://www.union.org.mx/guia/actividadesyagravios/mineria.htm>.
- Gutiérrez, M.E. y M. Moreno. 1997. Los residuos en la minería mexicana. INE, México. Disponible en Internet en: http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/35/los_residuos.html?id_pub=35
- Herrero, E.M., López González, A., Ruiz, M.A., Lucas García, J.A., Barbas, C. 2003. Uptake and distribution of zinc, cadmium, lead and copper in *Brassica napus* var. oleifera and *Helianthus annuus* grown in contaminated soils *International Journal of Phytoremediation*. 5: 153-167
- King, T.V., 1995. Environmental considerations of active and abandoned mine lands: lessons from Summitville, Colorado. USGS Bulletin 2220.
- Kumar, NPBA., Dushenkov, V., Motto, H., Raskin, I. 1995. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology* 29:1232-1238
- Laswell, J., Rogg, L.e., Nelson, D.C., Rongey, C. and Bartel, B. 2000 Cloning and characterization of IAR 1, a gene required for IAA conjugate sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12 2395-2408
- LeClere, S., Tellez, R., Rampey, R.A., Matsuda, S.P.T and Bartel, B. 2002 Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from *Arabidopsis* *Journal Biology Chem* 277 20446-20452
- Ljung, K., Hull, A.K., Kowalezyk, M., Marchant, A., Celenza, J., Cohen, J.D. and Sandberg, G. 2002 Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 50 309-332
- Lopez, M.L., Peralta, J.R., Benitez, T. y Gardea J.L. 2005 Enhancement of lead uptake by alfalfa (*Medicago sativa*) using EDTA and a plant growth promoter *Chemosphere* 61 595-598
- Ma, J.F. y Nomoto, K. 1996 Effective regulation of iron acquisition in graminaceous plants—the role of mugineic acids as phytosiderophores. *Physiologia Plantae*; 97: 609– 617
- Monni, S., Uhlig, C., Hansen, E., Magel, E. 2001. Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metal pollution *Environmental Pollution* 112: 121-129
- Normanly 1997 Auxin metabolism. *Physiology Planta* 100 431-442

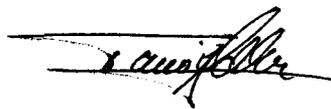
- Munzuroglu, O. y Greckil, H. 2002 Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptiles and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus* *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43, 203-213
- Ndung'u, K., Hibdón, S., Russell, A. 2004 Determination of lead in vinegar by ICP-MS and GFAAS: evaluation of different sample preparation procedures. *Talanta*, 64 258–263
- Östin, A., Kowalyczk, M., Bhalerao, R., Sandberg, G. 1998 Metabolism of Indole-3-Acetic Acid in *Arabidopsis* *Plant Physiology* 118 285-296
- Pellet, D.M., Grunes, D.I., Kochian, L.V. 1995 Organic acid exudation as an aluminum tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L). *Planta*;196: 788-795
- Raskin, I., Smith, R., Salt, D.E. 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 8221-8226
- Ramos-Arroyo, Y.R., Pral-Ledesma, R. M. y Siebe-Grabach, C. 2004 Características geológicas y mineralógicas e historia de extracción del Distrito de Guanajuato, México. Posibles escenarios geoquímicos para los residuos mineros. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 21-2 268-284.
- Reeves, RD. 1992 Hyperaccumulation of nickel by serpentine plants. In: Proctor J., (Editor.). The vegetative of ultramafic (serpentine) soils. *Journal of Intercept. Andover. UK*; p. 253–77
- Rivas, G., González, G., Valencia, C. M. , Sánchez, I., Villanueva, J. 2005 Morfología y escarificación de la semilla de mezquite, huizache y ahuehuete *Técnicas Pecuarias en México*; 43(3):441-448
- Rodushkin, I., Ruth, T., Huhtasaari, A. 1999 Comparison of two digestion methods for elemental determination in plant material *by ICP techniques*, *Acta* 378 191-200
- Rodríguez, O. J., Rodríguez, F.H., Lira, R.G., Martínez, C. J., Lara, M.J. 2006 Capacidad de seis especies vegetales para acumular plomo en suelos contaminados. *Fitotecnía Mexicana* 29(3) 239-245.
- Sanin, L. H., González-Cossío, T., Romieu, I., Hernández-Ávila, M. 1998 Acumulación de plomo en hueso y sus efectos en la salud. *Salud pública Méx.*40, 4, p.359-368. ISSN 0036-3634
- Sanita di Toppi, L.S., Gabbrielli, R. 1999 Response to cadmium in higher *plants* *Environmental experimental Botanic* 41: 105-130.
- Schmidt, U. 2003 Enhancing Phytoextraction: The effect of chemical soil manipulation on mobility, plant accumulation, and leaching of heavy metals. *Journal of Enviromental Quality*. 32 1939-1954
- Seaward, M. R. D., Richardson, D. H. S.1993 In Heavy Metal Tolerance in Plants. *Evolutionary Aspects*, Shaw, A. T., Ed.; CRC Press Inc. Boca Ratón, FL; pp 75-92

- Seregin, I. V., y Kozhevnikova, A. D 2005 Distribution of Cadmium, Lead, Nickel, and Strontium in Imbibing Maize Caryopses *Russian Journal of Plant Physiology* 52:4 565-569
- Sharma, P. y Dubey, R. S. 2005 Lead toxicity in plants *Brazilian Journal Plant Physiology* 17:1 35-52
- Singh, O. V., S. Labana, S., Pandey, G. y Budhiraja, R. 2003 Phytoremediation: An overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61 405-412
- Sresty, T.V.S. y Rao, K.V.M. 1999 Ultrastructural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cells of pigeon pea *Environmental experimental Botanic* 41: 3-13
- Talanova, V.V., Titov, A.F., Boeva, N.P., 1999 The effect of cadmium and lead ions on growth and proline and abscisic acid contents in cucumber seedlings *Russian Journal of Plant Physiology* 46: 141-143,
- Talanova, V.V., Titov, A.F., Boeva, N.P. 2000 Effect of increasing concentrations of lead and cadmium on cucumber seedlings. *Biol. Plant.* 43: 441-444
- Volke-Sepúlveda, T., Velasco-Trejo, J.A. y de la Rosa Pérez D. A. 2005 Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. *Instituto Nacional de Ecología - Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (INE-SEMARNAT)*. 141 pp
- Wang, J., Seliskar, D.M. y Gallagher, J.L. 2004 Plant regeneration via somatic embryogenesis in the brackish wetland monocot *Scirpus robustus*. *Aquatic Botany*, 79: 163-174.
- Weiqiang, L., Mohammad, A., Khan Shinjiro Y., y Yuji, K. 2005 Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* 46:45–50
- Wierzbicka, M. 1995 How lead loses its toxicity to plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 54: 81-91
- Wierzbicka, M. , Obidzinska, J. 1998 The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species *Plant Science* 137, 155–171
- Wickland, D.E. 1990 Vegetation of heavy metal contaminated soils in North America. - In: Shaw, A.J. (ed.): Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects. Pp. 39-51. CRC Press, Boca Raton
- Willd. 1806. *Acacia farnesiana* (L.) *Species Plantarum*. 4: 2 1083-1084
- Wilkins, D.A., 1978 The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth. *New Phytologist* 80 623-633
- Xiong, Z.T. 1997 Bioaccumulation and physiological effects of excess lead in a roadside pioneer species *Sonchus oleraceus* L. *Environmental Pollution* 97: 275-279

- Zakrzewski, S. 1991 Principles of Environmental Toxicology, *American Chemical Society*, Washington, DC.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la Tesis: Selección *in vitro* de plantas tolerantes a plomo para su uso en fitorremediación, que presentó la alumna de la Especialidad en Biotecnología Fátima Karmina Salas Salmerón

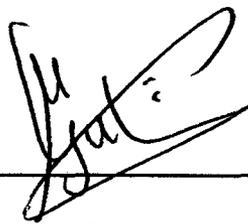
Asesor de Tesis:



Dra. Tania L. Volke Sepúlveda

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

Lector interno:



Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa