

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA



REMOCIÓN DE HIDROCARBUROS POR LA INTERACCIÓN PLANTA-
HONGO FILAMENTOSO BAJO CONDICIONES *IN VITRO*.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

I.B.I. ARELI CRUZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR: DR. MARIANO GUTIÉRREZ ROJAS

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2008

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el No. de Registro 0471-O”

Iztapalapa, D. F. 17 de Diciembre de 2008

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

**Remoción de hidrocarburos por la interacción planta-hongo filamentoso bajo
condiciones *in vitro*.**

Que presentó
IBI. Areli Cruz Hernández

Comité Tutorial:

Director: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Asesor: Dr. David Díaz Pontones

Asesor: Dr. Francisco Cruz Sosa

Jurado:

Presidente:

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

Dr. Sergio Huerta Ohoa

Secretario:

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

Dr. Francisco Cruz Sosa

Vocal:

Tecnológico de estudios superiores de Ecatepec

Dra. Mayola García Rivero

Vocal:

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

Dr. David Díaz Pontones

“Porque el verdadero cariño es incomparable”

A mis padres:

Macario y Maria Magdalena

A mis hermanos:

Jony, Elia, Arisbel, Olga, Miguel y Francisco

A la persona que amo

Ignacio

AGRADECIMIENTOS

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

Al Dr. David Díaz, al Dr. Francisco Cruz y con especial cariño al Dr. Mariano Gutiérrez por todo su apoyo, confianza, sugerencias, consejos durante la parte experimental y la escritura de la tesis.

A la M. en C. Gloria Trejo Aguilar, Dr. Tania L. Volke Sepúlveda y Dr. Felipe Martínez Orta, por su apoyo durante la parte experimental.

A todos mis amigos del Laboratorio de Residuos Sólidos; Pedro, Nancy, Cinthya, Asma, Oli, Lili, Amalia, Cesar, Manuel, Daniel, Bety, Ady, Guille y en especial a Miriam por su amistad y apoyo incondicional.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

1. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	7
1.1 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	7
1.2 FITORREMEDIACIÓN	10
1.2.1 Concepto de fitorremediación.....	10
1.2.2 Mecanismos de fitorremediación.....	10
1.3 PLANTA FITORREMEDIADORA.....	12
1.4 INTERACCIÓN PLANTA-MICROORGANISMO.....	13
2. JUSTIFICACIÓN.....	15
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS	17
4.1 GENERAL.....	17
4.2 ESPECÍFICOS.....	17
5. MÉTODOS Y MATERIALES.....	18
5.1 PLANTA.....	18
5.2 CEPAS DE HONGOS.....	18
5.3 PREPARACIÓN DEL CULTIVO.....	18
5.3.1 Desinfestación de las semillas.....	18
5.3.2 Tubos de cultivo.....	19
5.3.3 Cajas de cultivo.....	19
5.3.4 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.....	19
5.3.5 Hexadecano.....	19
5.4 EFECTO DE LOS HIDROCARBUROS	19
5.4.1 Hongos.....	19
5.4.2 Planta.....	20
5.4.3 Interacción planta-hongo.....	20
5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	20

5.5.1 Morfología macroscópica y microscópica de hongos.....	20
5.5.2 Crecimiento radial.....	21
5.5.3 Determinaciones en la planta.....	21
5.5.4 Interacción planta-hongo.....	21
5.5.5 Cuantificación de hidrocarburos.....	22
5.5.6 Análisis de los datos.....	22
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
6.1 HONGOS	23
6.1.1 Morfología de crecimiento de cuatro cepas de hongos filamentosos.....	23
6.1.2 Tasas de crecimiento radial de las cuatro cepas de hongos filamentosos.....	25
6.1.3 Crecimiento de las cuatro cepas de hongos filamentosos.....	26
6.1.4 Remoción de HC para las cuatro cepas de hongos filamentosos.....	28
6.2 PLANTA.....	29
6.2.1 Germinación de <i>F. arundinacea</i>	29
6.2.2 Crecimiento de <i>F. arundinacea</i>	30
6.2.3 Sobrevivencia de <i>Festuca arundinacea</i>	31
6.2.4 Remoción de MHC por <i>F. arundinacea</i>	32
6.3 INTERACCIÓN PLANTA-HONGO	33
6.3.1 Ensayo de fitopatogenicidad.....	33
6.3.2 Remoción de HC por la interacción planta-hongo.....	34
7. CONCLUSIONES	36
8. RECOMENDACIONES	37
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

RESUMEN

En este estudio se evaluó, bajo condiciones *in vitro*, el efecto de una mezcla conocida de dos diferentes hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP): fenantreno (PHE) y pireno (PYR) con un hidrocarburo alifático: hexadecano (HXD), sobre el crecimiento de cuatro cepas de hongos filamentosos; así como el efecto de la misma mezcla sobre la germinación, crecimiento y sobrevivencia de una planta (*Festuca arundinacea*) y la interacción entre *F. arundinacea*-hongo filamentoso (*Fusarium sp.*). Hongos y planta fueron cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) a una concentración de 1 500 mg de mezcla de hidrocarburos (MHC) (kg de medio)⁻¹. Para el caso de los hongos, después de 14 días de incubación se evaluó la remoción de la mezcla de hidrocarburos contenida en el medio MS. En la remoción de HXD y PHE no hubo diferencias significativas para la cuatro cepas (73 y 44% de remoción respectivamente), para PYR la cepa 4 (*Fusarium sp.*) presentó una remoción de 35.3%. A los 40 días de cultivo para *F. arundinacea*, el crecimiento se vio afectado significativamente; sin embargo, se observó una remoción del 55, 49.9 y 31.7% para HXD, PHE y PYR, respectivamente. La interacción entre cepa 4 y *F. arundinacea* favoreció significativamente la remoción de PYR del medio de cultivo, 61.8%; este resultado destaca la importancia de la interacción entre *F. arundinacea* y un hongo filamentoso bajo condiciones *in vitro*, en la remoción de HAP que tienen efectos carcinogénicos, como es el caso de PYR.

Palabras clave: *Festuca arundinacea*, Hidrocarburos, Hongo filamentoso.

ABSTRACT

The effect of a hydrocarbon mixture (HCM) of two polycyclic aromatic hydrocarbons: phenanthrene (PHE) and pyrene (PYR), and one aliphatic hydrocarbon: hexadecane (HXD) on the growth of four filamentous fungi strains was studied. Simultaneously, the effect of the HCM on germination, growth and survival of one grass (*Festuca arundinacea*) and on the interaction *F. arundinacea*-filamentous fungi under *in vitro* conditions were also studied. Fungi and plant were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium with HCM initial concentration of 1 500 mg kg⁻¹. In case of fungi, the HCM contained into MS medium removal, after 14 days of incubation, was evaluated. The removal of HXD and PHE were not significantly different for the four filamentous fungi assayed (73 and 44% removal respectively); while PYR was 35.4% removed by strain 4 after 40 days of culture. The plant growth was affected by initial concentration; however, there was a substantial removal of 55, 49.9 and 31.7% for HXD, PHE and PYR, respectively. The interaction strain 4-*F. arundinacea* significantly favored the removal of PYR of culture medium (61.8%), this result gives emphasize of the importance of interaction between *F. arundinacea* and the filamentous fungus (strain 4) under *in vitro* conditions in the removal of some carcinogenic PAH, such as PYR.

Key words: *Festuca arundinacea*, hydrocarbons, filamentous fungi.

INTRODUCCIÓN

La contaminación de suelo con hidrocarburos derivados del petróleo es un problema que se ha extendido como resultado de derrames de contenedores, rupturas en tuberías subterráneas y distintos procesos industriales. Entre los componentes del petróleo potencialmente carcinogénicos o mutagénicos se identifican los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), son compuestos hidrofóbicos, y su solubilidad en agua disminuye cuando aumenta su peso molecular (Parrish, 2005). En la actualidad se conocen técnicas biológicas para remediación como es el caso de la biorremediación, que se refiere al uso de organismos vivos para la restauración de sitios contaminados, como es el caso de los hongos filamentosos: se ha demostrado que *Fusarium solani* es capaz de degradar HAP (Verdin y col., 2005). Por otro lado, Fakoussa y Hofrichter (1999) reportan que *Fusarium sp* es capaz de degradar algunas sustancias de alto peso molecular como los hidrocarburos. Otra alternativa biológica que recientemente ha recibido mucha atención es la fitorremediación que tiene como objetivo degradar, asimilar, metabolizar o desintoxicar metales pesados, compuestos orgánicos y compuestos radioactivos aprovechando la acción combinada de plantas y sus microorganismos con capacidad fisiológica y bioquímica para absorber, retener, degradar o transformar sustancias contaminantes a formas menos tóxicas (López-Martínez y col., 2005). Sin la contribución de los microorganismos, la fitorremediación sola puede no ser una tecnología viable para muchos contaminantes orgánicos hidrofóbicos (Jussila, 2006). El uso de las poblaciones microbianas presentes en la rizosfera de las plantas se refiere como rizorremediación, este concepto desataca la importancia de la presencia de ambos: microorganismos y plantas. Los microorganismos que viven en la rizosfera pueden promover la salud de la planta, estimulando el crecimiento de las raíces (Escalante-Espinosa y col., 2005). La interacción benéfica planta-microorganismo en la rizosfera contribuye significativamente en la reducción, remoción, degradación o estabilización de contaminantes (Jussila, 2006).

El trabajo experimental se realizó bajo condiciones *in vitro* y se dividió en tres etapas, en la primera se evaluó el efecto de una mezcla hidrocarburos (MHC) compuesta de hexadecano (HXD), fenantreno (PHE) y pireno (PYR) en el crecimiento de cuatro cepas de hongos filamentosos, a su vez se evaluó la remoción de HXD, PHE y PYR por las cuatro cepas de

hongos filamentosos. En la segunda etapa se evaluó el efecto de la MHC (anteriormente mencionada) en la germinación, crecimiento y sobrevivencia de *Festuca arundinacea*, y se evaluó la remoción de HXD, PHE y PYR. En la tercera etapa se realizó una prueba de patogenicidad por cada uno de los cuatro hongos filamentosos para *F. arundinacea* y se evaluó la remoción de HXD, PHE y PYR por la interacción *F. arundinacea*-hongo filamentoso.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son un grupo de componentes orgánicos formados por dos o más anillos aromáticos fusionados, son producidos por la combustión incompleta de la materia orgánica, los HAP se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, hay más de 100 diferentes HAP presentes en mezclas complejas, no como un solo componente (Labana S. y col., 2007). Estos compuestos se caracterizan por ser hidrofóbicos, tener baja biodegradabilidad y por su elevado tiempo de residencia o persistencia en la naturaleza (Parrish y col., 2005). Una de las principales razones de la persistencia de los HAP en la naturaleza es su baja solubilidad en agua, lo cual incrementa su sorción con las partículas del suelo y limita su disponibilidad.

Los HAP son considerados contaminantes del ambiente y pueden tener un efecto perjudicial sobre la flora y la fauna, resultado de la absorción o acumulación de compuestos tóxicos en la cadena alimenticia, los cuales causan serios problemas a la salud y/o defectos genéticos en humanos (Labana S. y col., 2007). En México el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Medio Ambiente y Recursos Naturales en la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, establece Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos (Tabla 1). De acuerdo a su uso los productos asociados a los derrames de hidrocarburos para los que se establecen límites máximos permisibles de contaminación en suelos se enlistan en la Tabla 2. Con base en su abundancia y toxicidad, se ha identificado a 16 HAP por la agencia de protección ambiental de Estados Unidos (EPA) como contaminantes prioritarios, la estructura de estos compuestos se muestra en la Tabla 3.

Tabla 1. Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo.

FRACCION DE HIDROCARBUROS	Uso de suelo predominante ¹ (mg/kg base seca)		
	Agrícola ²	Residencial ³	Industrial
Ligera	200	200	500
Media	1 200	1 200	5 000
Pesada	3 000	3 000	6 000

1. Para usos de suelo mixto, deberá aplicarse la especificación al menor valor de los usos de suelo involucrados.

2. Agrícola incluye suelo forestal, recreativo, y de conservación.

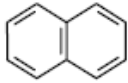
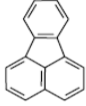
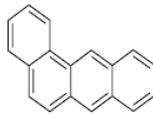
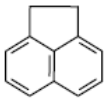
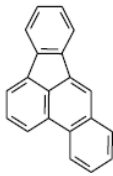
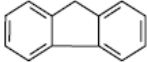
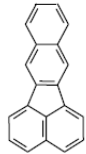
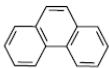
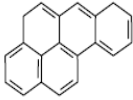
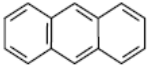
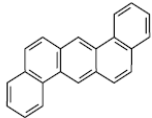
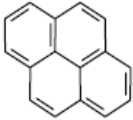
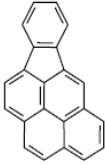
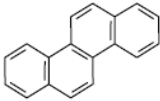
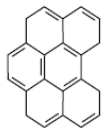
3. Industrial incluye comercial.

Tabla 2. Hidrocarburos que deberán analizarse en función del producto contaminante.

PRODUCTO CONTAMINANTE	HIDROCARBUROS					
	FRACCION PESADA	HAP	FRACCION MEDIA	HAP	FRACCION LIGERA	BTEX
Mezclas	X	X	X	X	X	X
Petróleo crudo	X	X	X	X	X	X
Combustóleo	X	X				
Parafinas	X	X				
Petrolatos	X	X				
Aceites	X	X				
Gasóleo			X	X		
Diesel			X	X		
Turbosina			X	X		
Keroseno			X	X		
Creosota			X	X		
Gasavión					X	X
Gasolvente					X	X
Gasolinas					X	X
Gasnafta					X	X

HAP: Hidrocarburos aromáticos policíclicos. BTEX: B, benceno; T, tolueno; E, etilbenceno; X, xilenos (suma de isómeros).

Tabla 3. Estructura de 16 Hidrocarburos aromáticos policíclicos listados por la agencia de protección ambiental de Estados Unidos como contaminantes prioritarios (Labana S. y col., 2007).

HAP	Estructura	HAP	Estructura
Naftaleno		Fluorantreno	
Acenaftileno		Benzo(a)antraceno	
Acenafteno		Benzo(b)fluorantreno	
Fluoreno		Benzo(k)fluorantreno	
Fenantreno		Benzo(a)pireno	
Antraceno		Dibenz(a,h)antraceno	
Pireno		Indenol[1,2,,3-c,d]pireno	
Criseno		Benzo(g,h,I)perileno	

1.2 Fitorremediación

1.2.1 Concepto de fitorremediación

La fitorremediación es una tecnología biológica, consiste en el uso de plantas, sus microorganismos asociados o enzimas para degradar, retener o reducir a niveles inofensivos los contaminantes ambientales. La fitorremediación puede ser usada para contaminantes líquidos, sólidos y gaseosos (Pilon-Smits, 2005).

La fitorremediación es una tecnología eficiente para una amplia variedad de contaminantes orgánicos e inorgánicos (Pilon-Smits, 2005). Muchos contaminantes orgánicos son tóxicos, algunos carcinogénicos. Estos contaminantes son liberados al ambiente por derrames (combustible, solventes), actividades militares (explosivos, químicos), agricultura (pesticidas, herbicidas), industrialmente (químicos, petróleo), etc. Dependiendo de sus propiedades, los contaminantes orgánicos pueden ser degradados en la zona de la raíz o traslocados a la parte verde, ahí degradados, secuestrados o volatilizados (Jussila, 2006; Pilon-Smits, 2005). Para incrementar la eficiencia de las tecnologías de la fitorremediación, es importante conocer más acerca de los mecanismos biológicos involucrados. Este incluye la interacción planta-microorganismo y otros procesos rizosféricos.

1.2.2 Mecanismos de fitorremediación

En la Tabla 4 se muestran los mecanismos principales de fitorremediación: fito-extracción ó fitoacumulación, fitodegradación, fitoestabilización, fitoestimulación, rizodegradación, y fitovolatilización, así como una descripción breve de los procesos involucrados para cada uno de ellos (Pilon-Smits, 2005. López-Martínez y col., 2005).

Tabla 4. Mecanismos de fitorremediación, así como los procesos involucrados.

Tipo	Proceso Involucrado
Fitoextracción	La planta absorbe al contaminante. El contaminante no puede degradarse totalmente, por lo tanto se acumula en la planta.
Fitodegradación	La planta (enzimas y cofactores), degradan y/o transforman al contaminante. Entre las enzimas de las plantas más conocidas en fitorremediación destacan; peroxidasas, monoxigenasas, nitroreductasas, nitrilasas y fosfatasas.
Fitoestabilización	La planta reduce la movilidad ó migración de los compuestos en el suelo. Modifica las condiciones del suelo (por ejemplo pH y humedad) debido a la interacción rizosfera – sustrato.
Fitoestimulación	La planta produce exudados radiculares que promueven el desarrollo de microorganismos degradadores (bacterias y hongos).
Rizodegradación	Los microorganismos en la rizosfera degradan a los contaminantes.
Fitovolatilización	Las plantas absorben por sus tejidos a los contaminantes y los transforman a su forma volátil. Entonces son liberados a la atmósfera mediante la transpiración.

La realización de tecnobgías de fitorremediación en ambientes contaminados con compuestos orgánicos implica la selección previa de especies de plantas que reúnan las siguientes características:

- ❖ Capaces de absorber y degradar contaminantes orgánicos.
- ❖ Excretar exudados para estimular la multiplicación de microorganismos degradadores y la secreción de enzimas que participen en la transformación de los contaminantes.

- ❖ Resistencia contra los contaminantes, es decir, el crecimiento y metabolismo de las plantas no debe verse afectado.
- ❖ Un sistema de raíz fibroso.
- ❖ Aclimatación a las condiciones climáticas del sitio que se pretende limpiar.

Por lo tanto es importante seleccionar cuidadosamente la especie de planta con la que se trabajará. Sin embargo, el potencial ecológico de cada planta en particular varía en función de los criterios enlistados anteriormente. Indudablemente, la parte más importante de las plantas es el sistema de la raíz, se ha observado que las plantas con crecimiento de raíces fibrosas que forman densas rizosferas son un buen prospecto para la fitorremediación (Kvesitadze y col., 2006).

La familia de las Poaceae es una de las más importantes para fitorremediación de metales pesados y compuestos orgánicos tales como los hidrocarburos del petróleo. Una ventaja de esta familia es que muchas especies poseen un sistema de raíz denso y fibroso. Entre las especies de grano que producen mayor biomasa está el maíz (*Zea mays*), es cual es tolerante a los metales pesados y petróleo; entre los cereales, todas las variedades de trigo (*Triticum aestivum*) y cebada (*Hordeum vulgare*) han sido recomendadas para fitorremediación. Sin embargo, cuando el sitio contaminado es salino, la cebada es el más tolerante de los cereales. Entre las gramíneas forrajeras, *Lolium* y *Festuca* son tolerantes a los hidrocarburos del petróleo incluyendo a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Gawronski y Gawronska, 2007).

1.3 Planta fitorremediadora

Festuca arundinacea (Schreber), también es conocida con el nombre común de *festuca* alta, pertenece a la familia Poaceae, es un pasto perenne amacollado de clima templado. Este pasto es nativo de Europa y norte de África.

F. arundinacea está bien adaptada en áreas húmedas y templadas. En México, se encuentra en zonas templadas y semicálidas, localizadas en el centro y norte del país. Se caracteriza por

poseer un sistema radicular extenso, profundo y fibroso, se emplea para controlar la erosión del suelo y por su frecuente presencia en sitios contaminados es atractiva para fitorremediación.

F. arundinacea ha sido comúnmente utilizada en estudios de fitorremediación *in vitro* e *in situ* de contaminantes orgánicos, como por ejemplo en el trabajo de Reynoso-Cuevas y col., (2008) utilizaron a *F. arundinacea* como control en estudios de fitorremediación *in vitro* de una mezcla de HAP y aceite crudo maya. En estudios de invernadero para evaluar el crecimiento de la misma en suelos contaminados con aceite crudo maya (White y col., 2003), además se han reportado estudios en suelo para evaluar la degradación de HAP por *F. arundinacea* (Chen y col., 2003; Ho y col., 2007).

1.4 Interacción planta-microorganismo.

Con base en sus efectos, los microorganismos que interactúan con las plantas pueden clasificarse en patógenos, saprofitos, benéficos y endofitos. Los patógenos pueden atacar las hojas, tallo o raíces. Los saprofitos se alimentan de la materia muerta de las plantas. Los microorganismos benéficos pueden clasificarse, a su vez, de acuerdo al objetivo de su aplicación en: biofertilizantes, fitoestimuladores, rizorremediadores y biopesticidas (Lugtenberg y col., 2002). Todas las plantas hospedan una variedad de hongos y bacterias que no causan síntomas de enfermedades visibles. Para describir estos organismos, la expresión “endofito” fue introducido por De Bary en 1866. Endofito fue definido como los microorganismos que colonizan los tejidos de las plantas sin causar algún daño inmediato, entonces los organismos gastan una mínima parte de su ciclo de vida intracelularmente en los tejidos saludables de las plantas hospedadoras. Las interacciones hospedero-endofito pueden bajo ciertas circunstancias provocar enfermedad, la cual ha sido descrita como una simbiosis desbalanceada (Tarkka y col. 2008). Comúnmente en interacciones endofitas se provee de nutrientes al microorganismo endofito y la protección de estrés ambiental y competencia con otros organismos a la planta. La infección de la planta con organismos endofitos puede mejorar la adaptabilidad ecológica de las plantas en ambientes de estrés como la sequía. Además, las plantas infectadas con endofitos a menudo muestran mejora en su crecimiento

comparado con las plantas no infectadas. Este efecto puede ser debido a la producción de fitohormonas como el ácido indol-3-acético, citoquininas y/o fijación de nitrógeno, también por la habilidad de las plantas para mejorar la absorción de nutrientes. Los hongos endofitos provienen de ciertos pastos que han mejorado su protección contra herbívoros, algunas bacterias y hongos patógenos, nematodos y mamíferos. La presencia de organismos endofitos ha sido registrada en casi todas las plantas vasculares, así como las algas marinas. Los organismos endofitos que han sido aislados de raíces, tallos, hojas y semillas son hongos, bacterias, algas e insectos (Tarkka y col. 2008).

Para fines de fitorremediación, en la interacción planta-microorganismo, la presencia de microorganismos en la rizosfera de las plantas contribuye a la actividad biológica que se desarrolla en la rizorremediación; el término comprende ambos mecanismos, fitoestimulación y rizodegradación. Los microorganismos juegan un papel importante en estos mecanismos; en la fitoestimulación produciendo auxinas implicadas en el alargamiento de la raíz y en el caso de la rizodegradación, degradando contaminantes. Por otro lado, las plantas exudan compuestos orgánicos derivados de la fotosíntesis (Pilot-Smit, 2005). Estos exudados de la raíz contienen compuestos solubles e insolubles en agua, compuestos volátiles, incluyendo azúcares, alcoholes, aminoácidos, proteínas, ácidos orgánicos, nucleótidos, flavonoides, compuestos fenólicos y ciertas enzimas. Algunos de estos componentes orgánicos pueden servir como fuente de carbono y nitrógeno para el crecimiento de los microorganismos que son capaces de degradar contaminantes orgánicos. La naturaleza y cantidad de los exudados de la raíz son importantes para los microorganismos que colonizan la rizosfera, que, a su vez, aportan otras sustancias que benefician a la planta para así estimular los procesos de rizorremediación. La interacción planta-microorganismo en la rizosfera a menudo es exitosa para remediar ambientes contaminados con compuestos orgánicos recalcitrantes (compuestos persistentes en el ambiente) (Jussila, 2006). Por lo tanto, es importante dilucidar cuál es la naturaleza de las interacciones entre las plantas y los microorganismos asociados a su rizosfera.

2. JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

Entre los componentes del petróleo se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos, estos compuestos se caracterizan por tener efectos carcinogénicos y/o mutagénicos. *F. arundinacea* es considerada como una planta fitorremediadora de contaminantes orgánicos, estudios previos han demostrado que este pasto es capaz de degradar hidrocarburos (Reynoso-Cuevas y col., 2008), pero tiene una limitación, el crecimiento de esta planta es lento, por lo tanto, el tiempo para fitorremediar puede ser muy prolongado. La contribución de los microorganismos, por ejemplo, los hongos filamentosos capaces de degradar compuestos orgánicos en interacción con la planta pueden mejorar la eficiencia de la fitorremediación

3. HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

La remoción de hidrocarburos bajo condiciones *in vitro* se favorece con la interacción planta-hongo.

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 General

Estudiar la remoción de hidrocarburos por la interacción entre *Fusarium sp* y *Festuca arundinacea* bajo condiciones *in vitro*.

4.2 Específicos

Evaluar el efecto de los hidrocarburos en el crecimiento de cuatro hongos filamentosos.

Evaluar la remoción de hidrocarburos por cuatro hongos filamentosos.

Evaluar el efecto de los hidrocarburos en la germinación, crecimiento y sobrevivencia de *F. arundinacea* bajo condiciones *in vitro*.

Evaluar la remoción de hidrocarburos por *F. arundinacea*.

Evaluar la eficiencia de remoción de hidrocarburos por la interacción entre *F. arundinacea* y cada uno de los cuatro hongos filamentosos bajo condiciones *in vitro*.

5. MÉTODOS Y MATERIALES

5. MÉTODOS Y MATERIALES

5.1 Planta

Las semillas de *Festuca arundinacea* (Schreber) se adquirieron en la Central de Abastos de la Cd. de México. Las semillas fueron separadas y conservadas en un cuarto a temperatura ambiente para su posterior desinfestación.

5.2 Cepas de hongos

Se utilizaron cuatro cepas de hongos filamentosos denominadas en este trabajo, cepas 1, 2, 3 y 4, las cepas 1 y 2 identificadas como *Fusarium sp.* Las cepas fueron aisladas de las semillas de cuatro especies de gramíneas: *Bouteloua curtipendula* (Michx) Torr, *Cenchrus ciliaris* L, *Lolium perenne* L y *Festuca arundinacea* (Schreber), respectivamente; las tres primeras plantas fueron colectadas en sitios contaminados en el Estado de Querétaro. Las cepas fueron utilizadas como inóculo para los estudios posteriores de degradación de hidrocarburos. Las cepas se conservan en el laboratorio W-108 de la UAM. La conservación de las cepas se realizó sobre cajas Petri con medio agar papa dextrosa (PDA), esterilizadas a 15 lb in^{-2} durante 15 min, posteriormente todas las cajas Petri fueron colocadas en bolsa de plástico en forma invertida dentro de una incubadora a 28-30°C, durante 7-10 días (Aquihuatl y Pérez, 2004).

5.3 Preparación del cultivo

5.3.1 Desinfestación de las semillas

Previo al tratamiento de desinfestación, se removieron a mano las semillas que se encontraban dañadas. Una vez seleccionadas 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} , por 20 min con agitación constante, y se lavaron con abundante agua de la llave. Bajo una campana de flujo laminar, el sobre con las semillas se sumergió en etanol 70% (v/v) durante 30 s, seguido por una solución de hipoclorito de sodio 10% (v/v) adicionado con 0.1 mL de TWEEN-20 por 30 min con agitación constante y nuevamente el sobre con las semillas se sumergió en etanol 70% (v/v) durante 1 min. El sobre se lavó con 150 mL de agua

desionizada estéril. El sobre se abrió bajo condiciones estériles y se colocó en caja de Petri estéril.

5.3.2 Tubos de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), se agregó 10 g L^{-1} de sacarosa, el pH se ajustó a 5.8 con KOH 0.1 N y se agregó 2 g L^{-1} de fitagel. Se adicionaron 10 mL de medio MS a cada tubo de cultivo con un diámetro 2.5 cm, altura 15 cm, cerrados y esterilizados a 15 lb in^{-2} durante 15 min. Los tubos se utilizaron para el cultivo de la planta y para los experimentos relacionados con la interacción planta-hongo.

5.3.3 Cajas de cultivo

Se utilizó medio MS con las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. Se adicionaron 25 mL de medio MS a cada caja Petri de vidrio con un diámetro de 8.5 cm. Se esterilizaron a 15 lb in^{-2} durante 15 min. Estas cajas se utilizaron para el cultivo de los hongos filamentosos.

5.3.4 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

Se utilizó fenantreno (PHE) con una pureza mayor al 96 %, pireno (PYR) con una pureza mayor al 98 %, los dos adquiridos en la Compañía Química Aldrich. Los HAP se incorporaron a los medios de cultivo disueltos en diclorometano (DCM) (Mallinckrodt Chemical).

5.3.5 Hexadecano

El hexadecano (HXD) se adquirió de la Compañía Química Aldrich. La sustancia se adicionó disuelta en diclorometano (DCM).

5.4 Efecto de los hidrocarburos

5.4.1 Hongos

El crecimiento de *Fusarium sp.* (cepas 1, 2, 3 y 4) se evaluó con y sin hidrocarburos. La mezcla de hidrocarburos (MHC) estaba compuesta de HXD y una mezcla de HAP (1:1; v/p); la mezcla de HAP fue: PHE:PYR (1:1; p/p). La concentración de MHC fue $1500 \text{ mg (kg de medio)}^{-1}$ que contenía: HXD, 3.3 mM; PHE, 2.1 mM y PYR, 1.85 mM. Todos los

hidrocarburos se adicionaron disueltos en DCM, a partir de una solución stock que contenía 50 g L⁻¹. El control sin MHC también se incluyó en los experimentos. La solución de MHC se incorporó a las cajas Petri que contenían medio MS y para eliminar el exceso de DCM se mantuvieron abiertas a temperatura ambiente durante 24 h, para posteriormente ser esterilizadas a 15 lb in⁻² durante 15 min. Las cajas Petri fueron inoculadas, bajo condiciones estériles, con biomasa extraída con un sacabocado estéril de otras cajas Petri (incubadas 48h en PDA) en discos de 5 mm de diámetro. Una vez inoculadas las cajas Petri, se incubaron a 30°C, durante 14 días. Al final se evaluó la tasa de crecimiento radial, y se cuantificó la biomasa producida y los hidrocarburos removidos.

5.4.2 Planta

La germinación, crecimiento y sobrevivencia *in vitro* de *Festuca arundinacea* fue evaluada con y sin MHC en tubos de cultivo (condiciones descritas en el apartado 5.3.2). La concentración de MHC fue 1 500 mg (kg de medio)⁻¹. En cada tubo se colocó una semilla previamente desinfestada. Una vez sembrados los tubos bajo condiciones estériles, se conservaron cerrados con tapas de plástico y sellados con parafilm a 25°C, con fotoperíodos de 16/8 h día/noche durante 20 días para los estudios de germinación y 40 días para el crecimiento y la sobrevivencia.

5.4.3 Interacción planta-hongo

La interacción entre *F. arundinacea* y la cepa 4 fue evaluada con y sin MHC en tubos de cultivo (mismas condiciones descritas en el apartado en 5.3.2). A los 20 días de cultivo se inoculó con discos (ver 5.4.1) de 5 mm de diámetro provenientes de la cepa 4. La concentración inicial de MHC fue 1 500 mg (kg de medio)⁻¹. Después de 40 días de cultivo se cuantificaron los HC residuales, crecimiento y biomasa de la planta y del hongo.

5.5 Métodos analíticos

5.5.1 Morfología macroscópica y microscópica de hongos

Se realizaron observaciones macroscópicas para conocer la morfología de crecimiento de las cepas. Se identificó color y textura. Para observar la estructura microscópica se realizaron

microcultivos, montados en un porta objetos, a 30°C por 72 h Se observó en un microscopio óptico de contraste de fases. Contrastado con azul de lactofenol, un colorante específico para hongos.

5.5.2 Crecimiento radial

La medición del crecimiento radial se realizó con una regla de 30 cm (1:10); por caja se realizaron 4 mediciones como se muestra en la Figura 1. Las determinaciones se realizaron por triplicado a los 0, 3, 6, 9, 12, 14 días, o hasta que la superficie de la caja estuviera completamente cubierta.

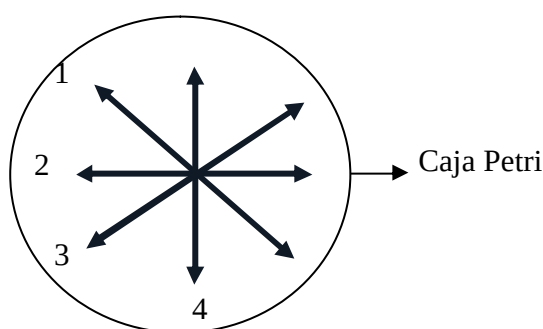


Figura 1. Medición del crecimiento radial sobre la superficie del medio de cultivo.

5.5.3 Determinaciones en la planta

La germinación se consideró como positivo o negativo diariamente durante los 20 días del ensayo, se consideró positivo si hubo crecimiento de la radícula; por otro lado, se evaluó crecimiento y sobrevivencia hasta los 40 días. El crecimiento se realizó midiendo con un vernier la parte aérea y la raíz, se aplicó el criterio de tomar la hoja y la raíz más grande de cada una de las plantas al término del periodo experimental. La sobrevivencia como positiva o negativa; se consideró positiva si la planta es verde y saludable comparada con el control sin MHC.

5.5.4 Interacción planta-hongo

Se realizó un ensayo para detectar cualquier efecto fitopatógeno por las cuatro cepas de hongos filamentosos en interacción individual (cada una de las cepas creciendo con la planta) con *F. arundinacea*. Cuando *F. arundinacea* tenía 20 días de cultivo se inocularon los tubos

de cultivo (mismas condiciones descritas en el apartado 5.3.2) con discos de 5 mm de diámetro de micelio obtenidas, bajo condiciones estériles, de los cultivos crecidos en cajas Petri. Después de los 40 días la prueba de fitopatogenicidad se consideró como positiva o negativa; será negativa si la planta es verde y saludable comparada con el control sin hongo.

5.5.5 Cuantificación de hidrocarburos

La cuantificación de HXD, PHE y PYR se llevó a cabo con un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo a masas HP6890 y una columna HP-5MS de 30 m por 0.250 mm de diámetro, D.I. 0.25 μ . Las condiciones de operación fueron: gas acarreador helio con un flujo de 25.2 mL min⁻¹; temperatura del inyector y columna de 300°C y la del detector de 250°C.

5.5.6 Análisis de los datos

Para el análisis estadístico se utilizó NCSS-2000, versión 2001. El análisis de varianza (ANOVA) se realizó con la prueba de Tukey-Kramer con un $\alpha = 0.01$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Hongos

6.1.1 Morfología de crecimiento de cuatro cepas de hongos filamentosos.

Los hongos forman un grupo de organismos heterogéneos. Las características morfológicas de los hongos filamentosos durante su crecimiento son el primer parámetro para identificarlos. Un hongo se identifica en primer lugar por la morfología macroscópica de la colonia, en la Figura 2 se muestra que todas las cepas, son de textura algodonosa; la cepa 1 tiene un color blanco-crema, la cepa 2 oscuro-verde y por la parte inferior café oscuro, la cepa 3 y 4 color rosa, por la parte inferior la cepa 3 con bordes de color café al centro. Los hongos se caracterizan a nivel de género y especie por la morfología del micelio. Desde el punto de vista microscópico estas cepas están constituidas por células alargadas, dispuestas linealmente formando una estructura filamentosa denominada hifa, toda son septadas excepto la cepa 4 como se aprecia en la Figura 3. Otro aspecto importante para la caracterización de los hongos a nivel microscópico es la presencia de esporas o de estructuras relacionadas con la reproducción. Los hongos filamentosos, asexualmente, forman esporas unicelulares de fácil dispersión, en el caso de las cepa 1, 3 y 4 no se visualizan órganos de esporulación durante el crecimiento del micelio, por el contrario la cepa 2 presentó conidióforos, estructura sacular donde se localizan las esporas (Figura 3).

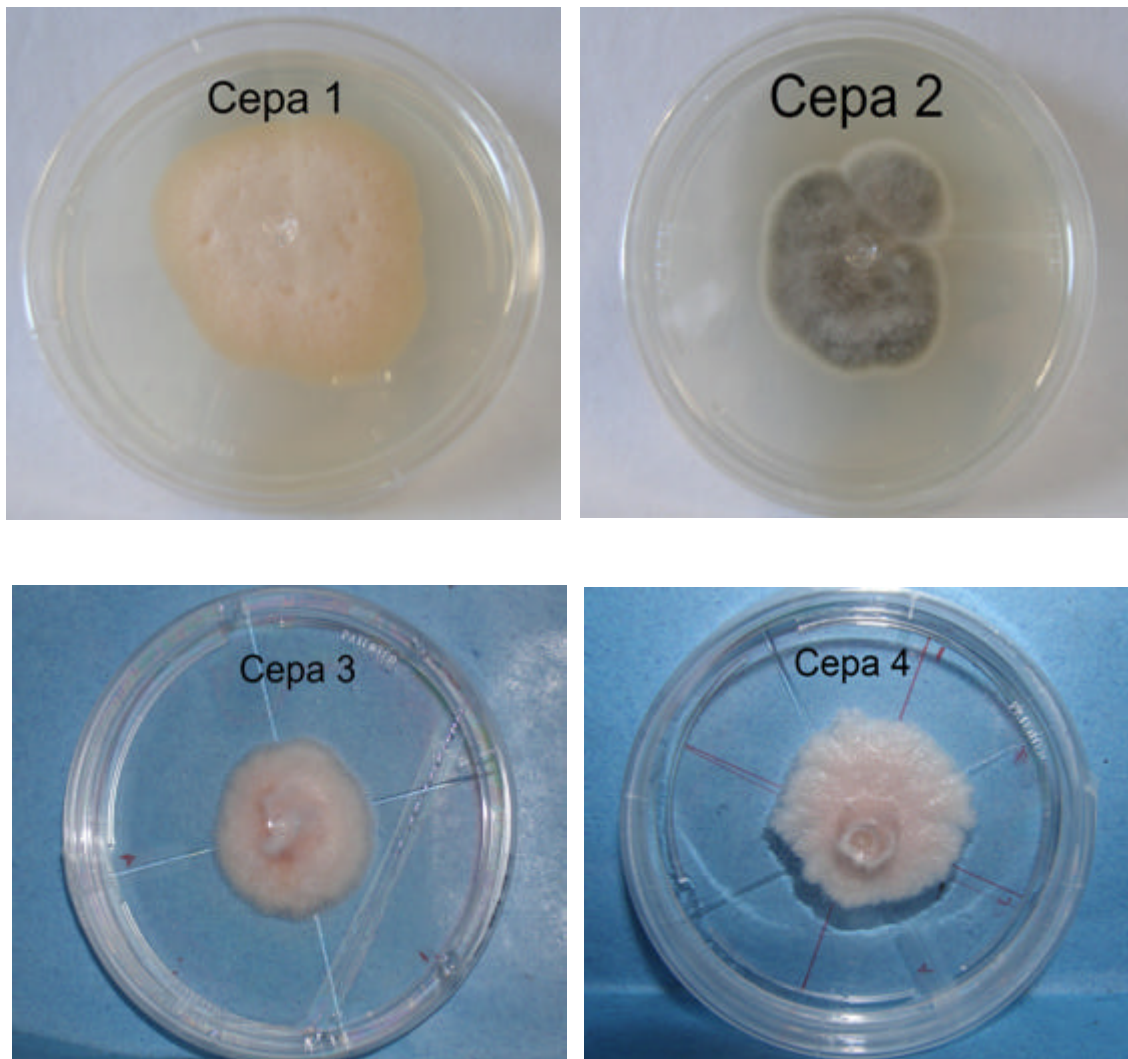


Figura 2. Morfología macroscópica de las cuatro cepas de hongos filamentosos.

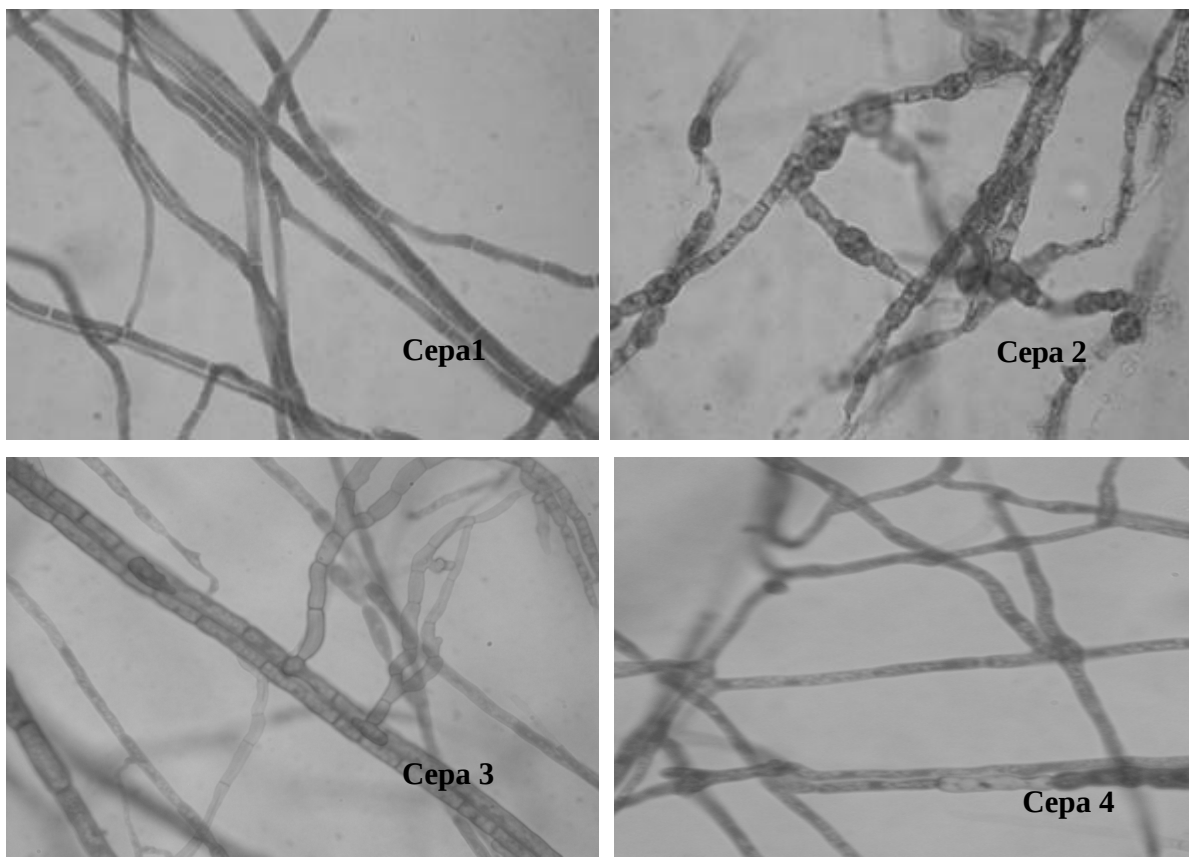


Figura 3. Morfología microscópica de las cuatro cepas de hongos filamentosos.

6.1.2 Tasas de crecimiento radial de las cuatro cepas de hongos filamentosos.

La tasa de crecimiento radial es una característica propia de cada cepa por lo que su evaluación es de utilidad para la caracterización de las cepas. En la Figura 5 se observa que en ausencia de MHC la cepa 1 alcanzó la mayor tasa de crecimiento radial, 5.34 mm día^{-1} . En presencia de MHC las cepas 1 y 2 presentaron una disminución en las tasas de crecimiento de 42.7% y 52.8%, respectivamente, con respecto a los experimentos en ausencia de hidrocarburos. El mismo comportamiento fue reportado para una cepa de *Rhizopus arrhizus* UCP402 creciendo en PDA con una concentración de 10 y 50 mg L^{-1} de PYR, mostrando una disminución en el crecimiento del micelio con respecto al control sin PYR de 12.5% y 37.5% respectivamente (Shiosaki y col., 2008). Para las cepas 3 y 4 no hubo diferencias significativas en el crecimiento radial en ausencia y en presencia de la MHC. La reducción en el crecimiento

celular puede deberse a la presencia de compuestos tóxicos tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Sin embargo, la inhibición de los mecanismos fisiológicos de los hongos en presencia de HAP es probablemente un efecto particular sobre la integridad estructural y propiedades de la membrana celular (Shiosaki y col., 2008).

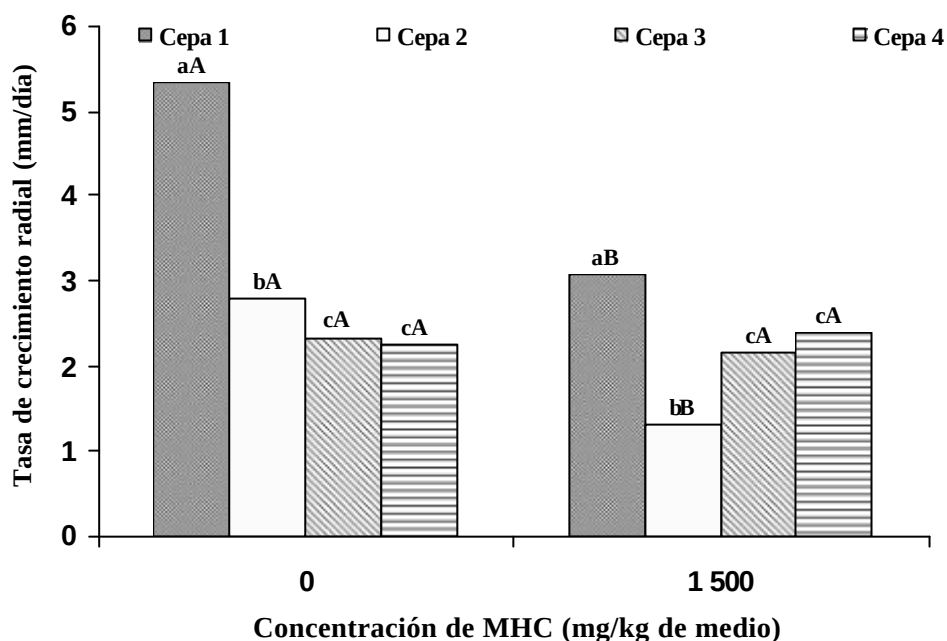


Figura 5. Tasas de crecimiento radial de las cuatro cepas de hongos filamentosos en cajas de cultivo evaluadas durante los 14 días de incubación. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes significativamente de acuerdo a la prueba Tukey-Kramer ($\alpha = 0.01$). Letras minúsculas indican comparación entre cepas (para 0 y 1500 mg/ kg de medio). Letras mayúsculas indican comparación entre tratamientos (0 y 1500 mg/ kg de medio) para la misma cepa. El valor estándar $\bar{x} \pm SD, n = 3$.

6.1.3 Crecimiento de las cuatro cepas de hongos filamentosos

El *habitat* natural de casi todos los hongos filamentosos contiene siempre nutrientes distribuidos de manera heterogénea. Las diferentes partes de un hongo filamentosos que prolifera en estos ambientes, encontrarán diferentes tipos y concentraciones de nutrientes, pero siempre suficientes como para lograr un buen crecimiento (Deacon, 2006). En nuestro trabajo, se observó crecimiento de las cuatro cepas de hongos filamentosos en un medio con requerimientos específicos para las plantas. En la Figura 4 se muestra el crecimiento

expresado como la biomasa total generada de cada una de las cepas ensayadas, después de 14 días de incubación. Las concentraciones fueron 0 y 1 500 mg MHC (kg de medio)⁻¹.

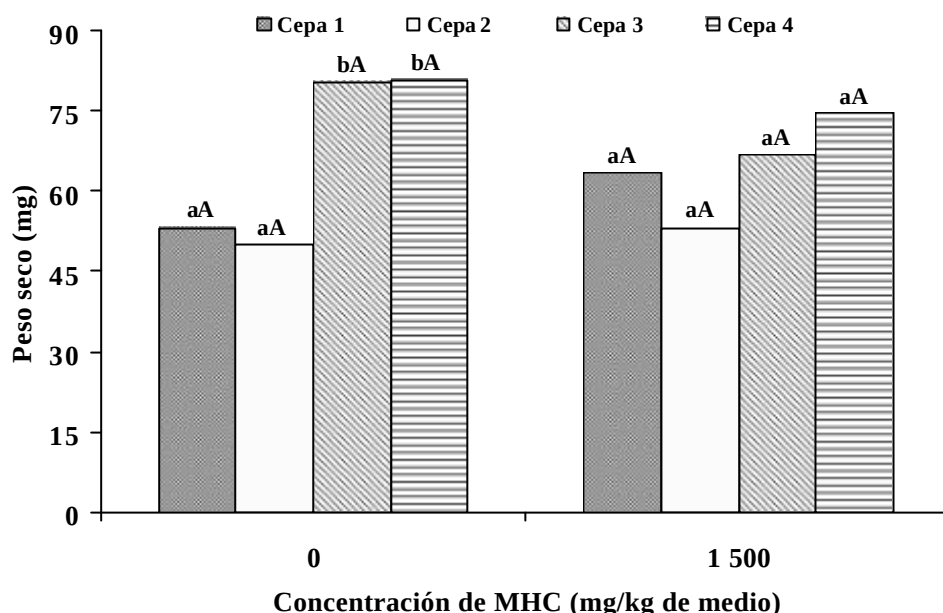


Figura 4. Biomasa producida por cada una de las cuatro cepas de hongos filamentosos en cajas de cultivo a los 14 días de incubación. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes significativamente de acuerdo a la prueba Tukey-Kramer ($\alpha = 0.01$). Letras minúsculas indican comparación entre cepas (para 0 y 1 500 mg/ kg de medio). Letras mayúsculas indican comparación entre tratamientos (0 y 1 500 mg/ kg de medio) para la misma cepa. El valor estándar $\bar{x} \pm SD$, $n = 3$.

Como se puede apreciar, en ausencia de MHC se observó que el mayor crecimiento fue para las cepas 3 y 4 (80.6 ± 15 y 80.7 ± 12 mg), respectivamente; seguido de la cepa 1 y 2 (53.3 ± 6 y 50 ± 0 mg), respectivamente. En presencia de la MHC no hubo diferencias significativas en el crecimiento de las cuatro cepas de hongos filamentosos. Haciendo comparación por cepa en ausencia y en presencia de la MHC, no hay diferencias significativas para las cuatro cepas de hongos filamentosos. Verdin y col., (2005) reportaron que *Fusarium solani* creciendo en un medio sintético con antraceno, pireno, benzo(a)pireno, benzo[ghi]perileno y coroneno a una concentración de 0.4 mM no encontraron diferencias significativas en su crecimiento después de 30 días de incubación, comparado con el control sin HAP.

6.1.4 Remoción de HC para las cuatro cepas de hongos filamentosos.

La capacidad para remover una concentración inicial de 18.75 mg HXD (caja de cultivo)⁻¹, 9.375 mg PHE (caja de cultivo)⁻¹ y 9.375 mg PYR (caja de cultivo)⁻¹ por las cuatro cepas de hongos filamentosos, se evaluó después de 14 días de incubación. La remoción de HXD y PHE por las cuatro cepas no mostró diferencias significativas. En el caso del PYR la mayor remoción se observó para la cepa 4, como se aprecia en la Tabla 5, que removió un 35.3%, lo que equivale a 3.3 mg (caja de cultivo)⁻¹, estos niveles de remoción son mayores que aquellos reportados para la remoción de pireno por *Fusarium sp.*, (22%), creciendo en un suelo contaminado con 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos de 3-7 anillos (Potin y col., 2004). Por el contrario son menores que aquellos removidos por *Fusarium sp.*, inmovilizado en suelo contaminado con PHE y PYR, de 52.7% (Li y col., 2005). En estudios de Verdin y Col. (2005) *Fusarium solani* removió el 70% del PYR adicionado en un medio sintético con HAP de 3-7 anillos.

Tabla 5. Hidrocarburos removidos por las cuatro cepas de hongos filamentosos en cajas de cultivo después de los 14 días de incubación.

	Remoción (mg (caja de cultivo) ⁻¹)		
	HXD	PHE	PYR
CEPA 1	13.7±0.3 ^a	3.8 ± 0.2 ^a	1.0 ± 0.2 ^a
CEPA 2	14.1 ± 0.8 ^a	4.0 ± 1.3 ^a	2.2 ± 0.04 ^{a,b}
CEPA 3	13.3 ± 2.1 ^a	3.5 ± 1.0 ^a	1.0 ± 0.3 ^{a,b}
CEPA 4	13.4 ± 1.2 ^a	5.2 ± 0.9 ^a	3.3 ± 1.8 ^b

Valores de la columna seguidos por la misma letra no son diferentes significativamente de acuerdo a la prueba Tukey-Kramer ($\alpha = 0.01$). El valor estándar $\bar{x} \pm SD, n = 3$.

6.2 Planta

6.2.1 Germinación de *F. arundinacea*

La germinación de las semillas es el proceso de brotación, paso importante en el crecimiento de la planta. Algunas condiciones ambientales como la temperatura, la luz o el agua pueden activar la germinación, desencadenando la producción de hormonas, que son los compuestos orgánicos responsables de las respuestas de desarrollo o crecimiento de la célula en cuestión (Nabors, 2006). En la Figura 6 se muestra la germinación de *F. arundinacea*, hasta los 20 días del cultivo bajo condiciones *in vitro*, para tres tratamientos: (i) con MHC, (ii) sin MHC y (iii) con DCM, que es el disolvente empleado en este trabajo para la incorporación de los hidrocarburos en el medio de cultivo. En los tres casos, se observan diferentes niveles de germinación antes del sexto día de cultivo. La máxima germinación se observa después de 7 días. Después de los 7 días, ninguna semilla germinó, para ninguno de los tres tratamientos.

En nuestro trabajo, en el tratamiento con DCM (adición de 0.3 mL de DCM en cada tubo antes de agregar el medio) se encontró una germinación del 80% después de 7 días, el cual fue el mayor valor comparado con los dos tratamientos restantes: sin MHC, 70%; con MHC, 65%; este resultado puede ser explicado porque el solvente puede fragilizar o remover la testa, la capa externa de la semilla, y así facilitar el crecimiento de la radícula (Nabors, 2006). Se observó una disminución del 15% en la germinación con MHC en comparación con el tratamiento (iii). Sin embargo, la germinación fue afectada un 5% por la presencia de la MHC, comparando con el tratamiento sin MHC .

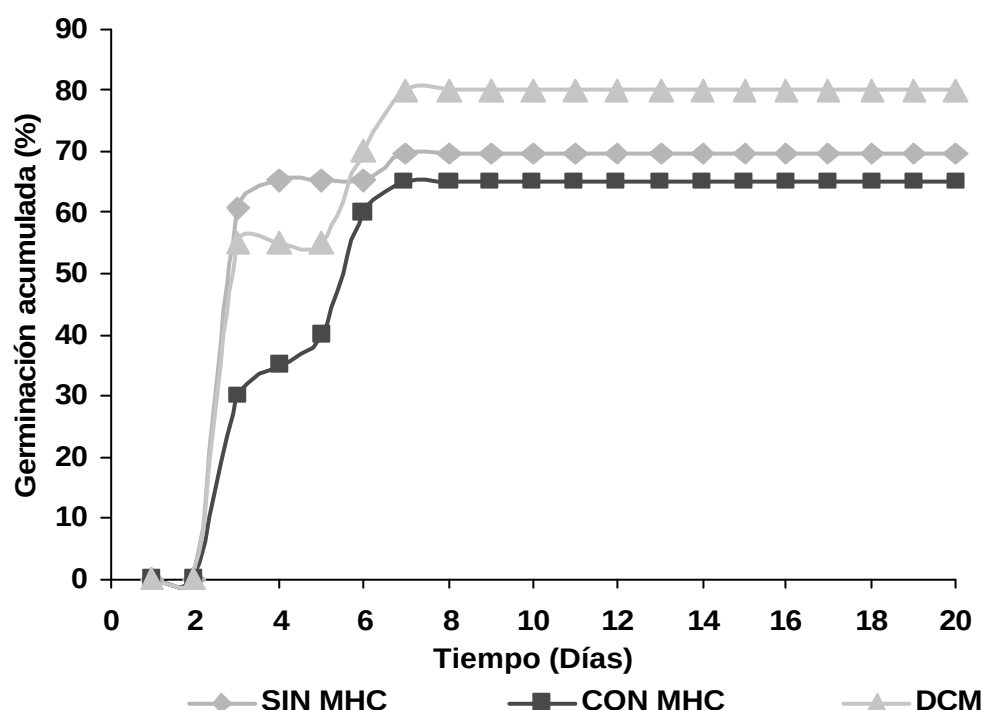


Figura 6. Germinación acumulada de *F. arundinacea* a los 20 días de cultivo bajo condiciones *in vitro* aplicando tres tratamientos.

6.2.2 Crecimiento de *F. arundinacea*

Normalmente el crecimiento primario en una planta produce tallos para alcanzar la luz, y raíces para alcanzar el agua y los minerales del suelo. El crecimiento de la raíz y tallo no funcionan de manera individual o aislada, sino que trabajan juntos; no solo para producir, transportar, y almacenar nutrientes, sino también para proporcionar sostén estructural y

protección vegetal (Nabors, 2006). El crecimiento de *F. arundinacea* fue evaluado como longitud y biomasa, de parte aérea y raíz, después de 40 días de cultivo. Los resultados se muestran en la Tabla 6. El crecimiento de *F. arundinacea* disminuyó en longitud y peso seco un 65 % en presencia de MHC comparado con el crecimiento sin MHC. En estudios previos se reporta que una mezcla de PHE, PYR, benzo(a)pireno y aceite crudo maya a una concentración de 1 500 mg (kg de medio)⁻¹, afecta hasta en un 55.5% el crecimiento *in vitro* de *F. arundinacea* (Reynoso-Cuevas y col., 2008). En nuestro trabajo, el crecimiento de la raíz no presentó diferencias significativas con y sin MHC, a diferencia del trabajo de Reynoso-Cuevas y col (2008) que sí disminuye en un 60%. El tipo y concentración de mezcla de hidrocarburos en el medio MS posiblemente tiene efectos tóxicos, provocando alteraciones en la morfología de la planta.

Tabla 6. Evaluación del crecimiento, bajo condiciones *in vitro*, de *F. arundinacea* a los 40 días de cultivo.

	Concentración MHC (mg(kg de medio) ⁻¹)	Peso seco (mg)	Longitud (cm)
Raíz	0	1 ± 0.6 ^a	9.67 ± 2.20 ^a
	1 500	0.56 ± 0.31 ^a	7.94 ± 1.06 ^a
Parte aérea	0	6.62 ± 2.63 ^a	24.22 ± 3.69 ^a
	1 500	2.28 ± 0.54 ^b	8.46 ± 3.53 ^b

Valores de la columna seguidos por la misma letra no son diferentes significativamente de acuerdo a la prueba Tukey-Kramer ($\alpha = 0.01$). El valor estándar $\bar{x} \pm SD$, $n = 5$.

6.2.3 Sobrevivencia de *Festuca arundinacea*

Las plantas pueden presentar mortalidad inmediatamente después del derrame de un contaminante. El grado de fitotoxicidad del contaminante es una característica importante para

que se lleve exitosamente la fitorremediación (Pilon-Smits, 2005). La respuesta de sobrevivencia fue evaluada como el número de plantas que sobreviven de un total de 50 plantulas cultivadas, en una concentración inicial de 1 500 mg (kg de medio)⁻¹ *F. arundinacea* presentó una sobrevivencia de 98% a los 40 días de cultivo, este comportamiento es similar con lo reportado en el trabajo de Reynoso-Cuevas y col. (2008) para *F. arundinacea* en donde se observó una sobrevivencia del 100%, creciendo en cultivos *in vitro* con una mezcla de PHE, PYR, BaP y aceite crudo maya, a una concentración de 1 500 mg (kg de medio)⁻¹.

6.2.4 Remoción de MHC por *F. arundinacea*

La evaluación del potencial de desintoxicación de un contaminante orgánico por fitorremediación, es determinado con base en los mecanismos desarrollados por las plantas (fitovolatilización, fitodegradación y fitoestimulación) (Kvesitadze y Col., 2006). La capacidad de *F. arundinacea* para remover una concentración inicial de 7.5 mg HXD (tubo de cultivo)⁻¹, 3.75 mg PHE (tubo de cultivo)⁻¹ y 3.75 mg PYR (tubo de cultivo)⁻¹ se evaluó a los 40 días de cultivo. La remoción fue de 55.06%, 49.9% y 31.7% para HXD, PHE y PYR, respectivamente (Figura 7). La mayor remoción se observó para el HXD, esto puede deberse a el PHE y PYR están menos biodisponibles que el HXD, ya que uno de los factores más importante para llevar acabo exitosamente la fitorremediación es la biodisponibilidad de los componentes orgánicos (Jussila, 2006).

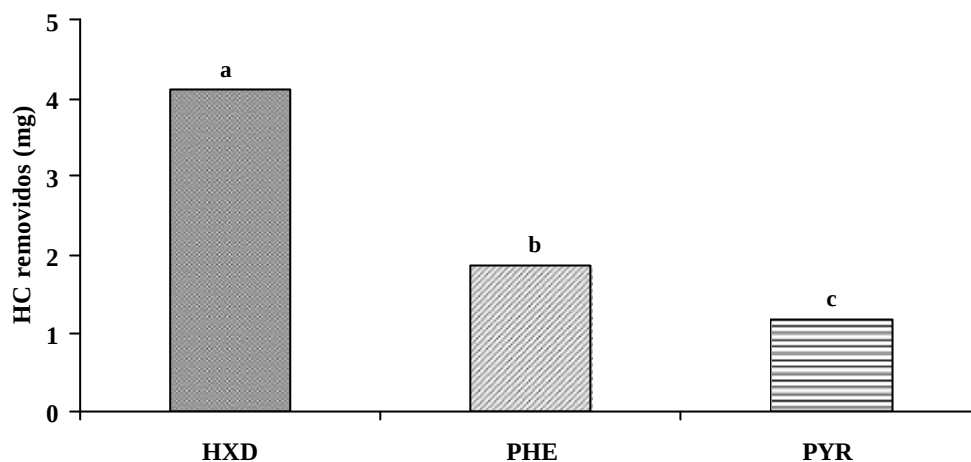


Figura 7. HC removidos por *F. arundinacea* en tubos de cultivo, bajo condiciones *in vitro*, a los 40 días de cultivo. Valores de las barras seguidos por la misma letra no son diferentes significativamente de acuerdo a la prueba Tukey-Kramer ($\alpha = 0.01$). El valor estándar $\bar{x} \pm SD$, $n = 5$.

6.3 Interacción planta-hongo

6.3.1 Ensayo de fitopatogenicidad

Con base en sus efectos sobre las plantas, los microorganismos que interactúan con plantas pueden clasificarse como patógenos, saprofitos y benéficos. Ninguna de las numerosas interacciones planta-microorganismo está completamente entendida (Lugtenberg y col., 2002). Por ahora es claro que los microorganismos que desarrollan alguna interacción con plantas pueden ser patógenos o benéficos (Lugtenberg y col., 2002). En el presente trabajo, se realizó una prueba de patogenicidad por las cuatro cepas del estudio en *F. arundinacea*. Cuando *F. arundinacea* interactuó con las cepas 1, 2 y 3, se observaron daños en la planta comparada con el control sin hongo (Figura 8). En otras palabras, *F. arundinacea* con la cepa 4 tienen una relación positiva, mientras que sufre daño con las cepas aisladas de las semillas de otros géneros de la familia Poaceae.

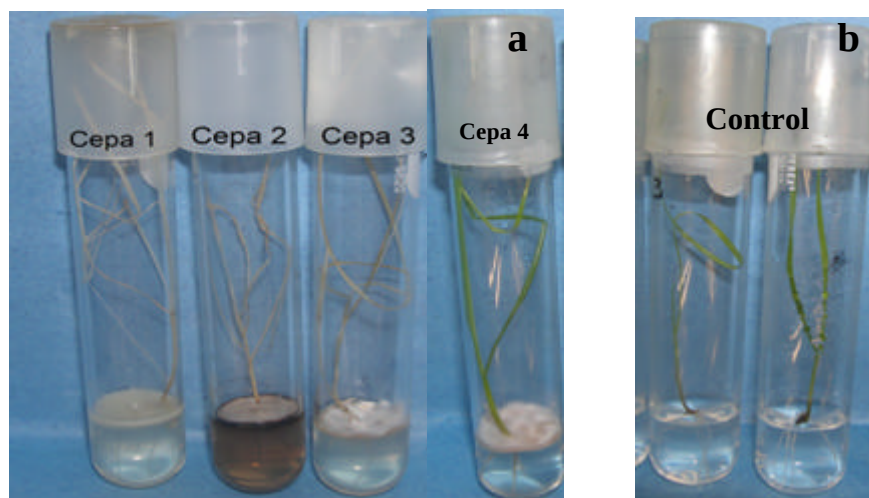


Figura 8. a. *F. arundinacea* en interacción con las cepas 1, 2, 3 y 4 a los 40 días de cultivo, creciendo en tubos de cultivo, **b.** Control (*F. arundinacea* sin hongo) a los 40 días de cultivo, creciendo en tubos de cultivo.

6.3.2 Remoción de HC por la interacción planta-hongo

La capacidad de la interacción *F. arundinacea*-cepa 4 para remover una concentración inicial de 7.5 mg de HXD (tubo de cultivo)⁻¹, 3.75 mg de PHE (tubo de cultivo)⁻¹ y 3.75 mg de PYR (tubo de cultivo)⁻¹ fue evaluada a los 40 días de incubación a 25 °C, la remoción fue de 5.4 mg (tubo de cultivo)⁻¹, 2.6 mg (tubo de cultivo)⁻¹ y 2.3 mg (tubo de cultivo)⁻¹ para HXD, PHE y PYR respectivamente. Para evaluar la contribución microbiana en la remoción de HC, en la Tabla 7 se muestra un análisis comparativo relacionado con el consumo individual para la cepa 4, el consumo individual para *F. arundinacea*, y para el caso de la interacción entre planta-hongo. Comparando con la cepa 4 sola, se observa que no hay un incremento significativo en la remoción de HXD y PHE cuando la cepa 4 se encuentra interactuando con *F. arundinacea*; sin embargo, la interacción *F. arundinacea*-cepa 4 favoreció significativamente la remoción de PYR. La importancia de la interacción planta-microorganismo en la rizosfera, a menudo es exitosa para la remediación de ambientes contaminados con componentes orgánicos recalcitrantes (Jussila, 2006), como es el caso de PYR. Esto podría deberse a que la planta provee de nutrientes al hongo por medio de los exudados radicales y el hongo reduce la toxicidad de los contaminantes orgánicos y ayuda a

la absorción de estos por las raíces de la planta. Además, aparentemente entre mas compleja es la molécula hay una mejor remoción en la interacción planta-hongo.

Tabla 7. Consumo de HC por la cepa 4, *F. arundinacea* y por *F. arundinacea* en interacción con la cepa 4, bajo condiciones *in vitro*.

Consumo* (mg Hidrocarburo (g medio) ⁻¹)			
	HXD	PHE	PYR
CEPA 4	0.536 ^b	0.208 ^{a,b}	0.132 ^a
<i>F. arundinacea</i>	0.413 ^a	0.187 ^a	0.119 ^a
<i>F. arundinacea</i> -cepa 4	0.543 ^b	0.26 ^b	0.232 ^b

* Para estandarizar en forma comparativa. Valores de la columna seguidos por la misma letra no son diferentes significativamente de acuerdo a la prueba Tukey-Kramer ($\alpha = 0.01$).

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se concluye lo siguiente:

A la concentración inicial de 1 500 mg MHC (kg de medio)⁻¹, no se observó efecto en el crecimiento de las cuatro cepas de hongos filamentosos. No hubo diferencia significativa en la remoción de HXD y PHE por las cuatro cepas, la mayor remoción de PYR se observó por la cepa 4 de un 35.3%.

La germinación de las semillas de *F. arundinacea* fue afectada un 5% por la presencia de la MHC. Se aprecia una clara disminución en el subsecuente crecimiento, altura y peso seco de la parte aérea. La sobrevivencia de *F. arundinacea* a los 40 días de cultivo *in vitro* en presencia de la MHC no se vio afectada. La mayor remoción se obtuvo para HXD, seguida de PHE y PYR, 55.06, 49.9 y 31.7%, respectivamente.

No se observaron diferencias en la remoción de HXD y PHE cuando *F. arundinacea* interactuó con la cepa 4. Sin embargo, la interacción *F. arundinacea*-cepa 4 favoreció significativamente la remoción de PYR.

8. RECOMENDACIONES

8. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este proyecto, para estudios posteriores se recomienda lo siguiente:

Determinar si se trata de una interacción endofítica (el hongo coloniza los tejidos internos de las plantas sin causar daños), haciendo un estudio morfológico que permitan entender el tipo de interacción benéfica entre *F. arundinacea* y un hongo filamentoso.

Comprobar que hay degradación de los hidrocarburos, determinando la presencia de metabolitos extracelulares e intracelulares derivados del metabolismo por el sistema planta-hongo.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aquiahuatl, Ma. A., y Pérez, Ma. L. 2004. Manual de prácticas del laboratorio de Microbiología General, Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana.

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

Deacon, J. 2006. Fungal growth. In: Fungal Biology (Deacon, J. Editor). Blackwell Publishing. 67-84.

Escalante-Espinosa, E., Gallegos, M. E., Favela, E., y 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.

Fakoussa, M., y Hofrichter, M. 1999. Biotechnology and microbiology of coal degradation. *Appl Microbiol Biotechnol*. **52**: 25-40.

Gawronski W. S. y Gawronska, H. 2007. Plant taxonomy for phytoremediation. In: Advanced Science and Technology for Biological Decontamination of Sites Affected by Chemical and Radiological Nuclear Agents (Marmiroli, N., Samotokin, B. y Marmiroli, M. Eds.). Springer Netherlands. 79-88.

Ho, C.H., Applegate, B. y Banks, M. K. 2007. Impact of microbial/plant interactions on the transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in rhizosphere of *Festuca arundinacea*. *International Journal of Phytoremediation*. **9**: 107-114.

Jussila, M. M. 2006. Molecular Biomonitoring during Rhizoremediation of Oil-Contaminated Soil, Doctoral Academic Dissertation University of Helsinki Finland, ISBN 952-10-3375-4. 80 pp.

Kvesitadze, G., Khatisashvili, G., Sadunishvili, T., y Ramsden, J. 2006. The ecological importance of plants for contaminated environments. In: Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants Basis of Phytoremediation (Kvesitadze, G., Khatisashvili, G., Sadunishvili, T., y Ramsden, J. Eds.). Springer Berlin Heidelberg. 167-207.

Labana S., M. Kapur, D. K. Malik, D. Prakash y R.K. Jain. 2007. Diversity, biodegradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Enviromental Bioremediation Technologies (Singh, S. N. y Tripathi, R. D. Eds.). Springer Berlin Heidelberg. 409-443.

Li, P., Li, H., Stagnitti, F., Wang, X., Zhang, H., Gong, Z., Liu, W., Xiong, X., Li, L., Austin, C., y Barry, D. A. 2005. Biodegradation of pyrene and phenanthrene in soil using immobilized fungi *Fusarium sp.*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **75**: 443–450.

López-Martínez, S., Gallegos, M. E., Pérez, L. J., y Gutiérrez-Rojas, M., 2005. Mecanismos de Fitorremediación de Suelos Contaminados con Moléculas Orgánicas Xenobióticas. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **21**: 91-100.

Lugtenberg, B. J. J., Chin-A-Woeng, T. F. C., y Bloemberg, G. V. 2002. Microbe–plant interactions: principles and mechanisms. *Kluwer Academic Publishers.* **81**: 373–383.

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

Nabors, M. W. 2006. Introducción a la estructura de las plantas. En: Introducción a la Botánica. (Nabors, M. W.). Pearson education. 55-79.

Nabors, M. W. 2006. La raíz, El tallo y las hojas: El cuerpo vegetal primario. En: Introducción a la Botánica. (Nabors, M. W.). Pearson education. 79-112.

Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003

Parrish, Z. D., Banks, M. K., y Schwab, A.P. 2005. Effect of root death and decay on dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of Yellow Sweet Clover and Tall Fescue. *J. Environ. Qual.* **34**: 207-216.

Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **56**: 15-39.

Potin, O., Rafin, C., y Veignie, E. 2004. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration & Biodegradation.* **54**: 45–52.

Reynoso-Cuevas, L., Gallegos-Martínez, M. E., Cruz-Sosa, F. y 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.

Shiosaki, R. K., da Costa Albuquerque, C. D., Okada, K., Fukushima, K., y Campos-Takaki, G. M. 2008. Monitoring the Effect of Pyrene on the Germination and Radial Growth of the Wild and Mutant Strains of *Rhizopus arrhizus* UCP402. *Braz. arch. biol. technol.* **51**: 613-621.

Tarkka, M., Schrey, S., y Hampp, R. 2008. Plant associated soil micro-organisms. In: Molecular mechanisms of plant and microbe coexistence (Nautiyal, C. S., Dion, P. Eds). Springer – Verlag Berlin Heidelberg. 03-35.

Verdin A., Loune`s-Hadj Sahraoui, A., Newsamb, R., Robinson, G. y Durand R. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environmental Pollution*. **133**: 283–291.

White, P. M. Jr., Wolf, D. C., Thoma, G.J., Reynolds, C. M. 2003. Influence of organic and inorganic soil amendments on plant growth in crude oil-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*. **5**: 381-398.