



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO- BIOLÓGICAS

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS. OPCIÓN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“Estudio de la absorción y transporte de Pb (II y IV) en la
Planta micorrizada *Tagetes erecta* L. (cempasúchil):
Implicaciones para la Fitorremediación”**

**Tesis que presenta el: MC Carlos
Juan Alvarado López**

**Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas**

**Directora de Tesis: Dra.
Nabanita Dasgupta-Schubert**

**Co-Director de Tesis: Dr.
Héctor Javier Villegas Moreno**

Morelia, Mich., Diciembre 2011

Contenido

RESUMEN	1
SUMMARY	3
CAPÍTULO 1	5
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	5
1.1 INTRODUCCIÓN	6
1.2 METALES PESADOS EN EL AMBIENTE	7
1.2.1 Movilización de Metales Pesados en el Suelo	10
1.3 PLOMO (Pb)	11
1.3.1 Fuentes de Contaminación de Pb en México	12
1.3.2 Efecto del Plomo en la Salud	14
1.3.3 Plomo en el Ambiente	15
1.3.4 Toxicidad del Pb en Plantas	18
1.3.5 Tolerancia al plomo en plantas	20
1.4 FITORREMEDIACIÓN	21
1.4.1 Fitodegradación	23
1.4.2 Degradación rizosférica	24
1.4.3 Rizofiltración	24
1.4.4 Fitovolatilización	25
1.4.5 Fitoextracción	25
1.4.6 Fitoestabilización	27
1.5 MECANISMO PARA LA CAPTURA Y TRANSPORTE DE METALES	29
1.5.1 Absorción de la raíz	29
1.5.2 Transporte hacia las hojas	29
1.5.3 Desintoxicación por quelación	30
1.5.4 Secuestro y/o volatilización del metal	30
1.6 SOLUBILIZACIÓN DE METALES DEL SUELO	32
1.6.1 Solubilización del Plomo en el suelo	32
1.7 HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES	35
1.7.1 Clasificación de los hongos micorrízicos arbusculares	37

1.8	HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES EN SUELOS CONTAMINADOS CON PLOMO	39
1.8.1	Hongos micorrizicos arbusculares en la Fitoestabilización de plomo	41
1.8.2	Hongos micorrizicos y fitoextraccion de plomo	44
1.9	ANTECEDENTES DE <i>Tagetes erecta</i>.	46
CAPÍTULO 2		49
METODOLOGÍA		49
2.1	EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i> .	50
2.1.1	Materiales y Métodos.	50
2.2	EXPERIMENTO CON DIFERENTES FUETES DE NITRÓGENO	55
2.2.1	Materiales y Métodos.	55
2.3	EXPERIMENTO CON 2 DIFERENTES TAMAÑOS DE MACETA.	63
2.3.1	Materiales y Métodos.	64
CAPÍTULO 3		68
RESULTADOS		68
3.1	Intra and extra radical responses of the <i>Daucus carota L.-Glomus intraradices</i> system to lead in <i>in vitro</i> cultures and its significance for the mycorrhizo-remediation of lead	69
3.2	DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO.	104
3.3	AUMENTO DEL ÁREA DE CRECIMIENTO.	121
CAPÍTULO 4		141
DISCUSIÓN		141
4.1	<i>IN VITRO</i>	142
4.2	FUENTES DE NITROGENO	144
4.3	VOLUMENES DE SUSTRATO	149
CAPÍTULO 5		155
CONCLUSIONES		155
APENDICES		157
	Apéndice 1	157
	Apéndice 2	159
	Apéndice 3	161
	Referencias	162

Indice de Figuras y Tablas

Figura 1. Esquema de Exposición Humana al Plomo y Cadena de Difusión	15
Figura 2. Esquematación de los Procesos de Fitorremediación	26
Figura 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL MECANISMO DE CAPTURA Y TRANSPORTE DE METALES PESADOS POR LAS PLANTAS	29
Figura 4. Efecto de la agregación de quelantes sintéticos en solubilidad de Pb.	32
Figura 5. Simbiosis Micorrízico Arbuscular.	35
Figura 6. Estructura taxonómica propuesta del Phylum <i>Glomeromycota</i>	36
Figura 7. Representación esquemática de la utilización de un HMA para la fitorremediación de Pb.	37
Figura 8. La absorción de cadmio por especies de plantas ornamentales	43
Figura 9. Microscopio estereoscópico marca Leica M80	49
Figura 10. Espectrómetro de fluorescencia polarizada de rayos X	51
Figura 11. Camas de madera para las macetas y contenedor para germinación	54
Figura 12. Concentrador para recuperar lixiviados en las macetas	57
Figura 13. Imágenes de plantas de <i>T. erecta</i> fertilizadas con NH_4 inoculadas y sin inocular con <i>G. intrarradices</i>	67
Figura 13. Imágenes de plantas de <i>T. erecta</i> fertilizadas con NO_3 inoculadas y sin inocular con <i>G. intrarradices</i>	68
Figura 14. Imágenes de raíces de plantas de <i>T. erecta</i> fertilizadas con NH_4 y NO_3 inoculadas con <i>G. intrarradices</i>	69
Figura 15. Porcentaje de colonización en plantas de <i>T. erecta</i> , fertilizadas con NH_4 y NO_3 inoculadas con <i>G. intrarradices</i>	70
Figura 16. Concentración de Pb en parte aérea de plantas de <i>Tagetes erecta</i> , fertilizadas con NH_4 y NO_3 inoculadas y sin inocular	71
Figura 17. Concentración de Pb en parte raíz de plantas de <i>T. erecta</i> , fertilizadas con NH_4 y NO_3 inoculadas y sin inocular	72
Figura 18. Concentración de Pb en planta entera	73

Figura 19. Factor de translocación para Pb de plantas de <i>T. erecta</i> , fertilizadas con NH ₄ y NO ₃ inoculadas y sin inocular	74
Figura 20. Factor de Bioconcentración de plantas de <i>T. erecta</i> , fertilizadas con NH ₄ y NO ₃ inoculadas y sin inocular	75
Figura 21. Peso seco de la parte aérea de plantas de <i>T. erecta</i> , fertilizadas con NH ₄ y NO ₃ inoculadas y sin inocular	76
Figura 22. Peso seco de la parte raíz de plantas de <i>T. erecta</i> , fertilizadas con NH ₄ y NO ₃ inoculadas y sin inocular	77
Figura 23. Biomasa de la planta de plantas de <i>T. erecta</i> , fertilizadas con NH ₄ y NO ₃ inoculadas y sin inocular	78
Figura 24. Área Foliar AF(cm ²) de plantas de <i>T. erecta</i> , fertilizadas con NH ₄ y NO ₃ inoculadas y sin inocular	79
Figura 25. Concentración de Pb en los lixiviados de plantas de <i>T. erecta</i> , fertilizadas con NH ₄ y NO ₃ inoculadas y sin inocular	80
Figura 26. El pH acumulativo durante el experimento de plantas de <i>T. erecta</i> , fertilizadas con NH ₄ y NO ₃ inoculadas y sin inocular	81
Figura 27. Cantidad de metal extraído Mp (µg) de plantas de <i>T. erecta</i> , fertilizadas con NH ₄ y NO ₃ inoculadas y sin inocular	82
Figura 28. Imágenes de plantas de <i>T. erecta</i> crecidas en macetas de 50g fertilizadas con NO ₃ inoculadas y sin inocular	84
Figura 29. Imágenes de plantas de <i>T. erecta</i> crecidas en macetas de 135g fertilizadas con NO ₃ inoculadas y sin inocular	85
Figura 30. Volumen de raíz de plantas de <i>T. erecta</i> inoculadas y sin inocular con <i>G. intrarradices</i> crecidas en macetas de 50g y en 135g	86
Figura 31. Longitud de la raíz de plantas de <i>T. erecta</i> inoculadas y sin inocular con <i>G. intrarradices</i> crecidas en macetas de 50g y en 135g	87
Figura 32. Micrografías de raíces teñidas de plantas de <i>T. erecta</i> inoculadas con <i>G. intrarradices</i> crecidas en macetas de 50g y en 135g	88
Figura 33. Porcentaje de colonización de raíces teñidas de plantas de <i>T. erecta</i> inoculadas con <i>G. intrarradices</i> crecidas en macetas de 50g y en 135g	89
Figura 34. Concentración de Pb en parte aérea, de plantas de <i>T. erecta</i>	

inoculadas y sin inocular con <i>G. intrarradices</i> , crecidas en macetas de 50g y en 135g	90
Figura 35. Concentración de Pb en parte raíz, de plantas de <i>T. erecta</i> inoculadas y sin inocular con <i>G. intrarradices</i> crecidas en macetas de 50g y en 135g	91
Figura 36. Concentración de Pb en plantas entera de plantas de <i>T. erecta</i> inoculadas y sin inocular con <i>G. intrarradices</i> crecidas en macetas de 50g y en 135g	92
Figura 37. El factor de translocacion de plantas de <i>T. erecta</i> inoculadas y sin inocular con <i>G. intrarradices</i> crecidas en macetas de 50g y en 135g	93
Figura 38. EL factor de bioconcentracion de plantas de <i>T. erecta</i> inoculadas y sin inocular con <i>G. intrarradices</i> crecidas en macetas de 50g y en 135g	94
Figura 39. Peso seco de la parte aérea de plantas de <i>T. erecta</i> inoculadas y sin inocular con <i>G. intrarradices</i> crecidas en macetas de 50g y en 135g	95
Figura 40. Peso seco de las raices de plantas de plantas de <i>T. erecta</i> inoculadas y sin inocular con <i>G. intrarradices</i> crecidas en macetas de 50g y en 135g	96
Figura 41. Biomasa de la planta de plantas de <i>T. erecta</i> inoculadas y sin inocular con <i>G. intrarradices</i> crecidas en macetas de 50g y en 135g	97
Figura 42. El aérea foliar (cm ²) de plantas de <i>T. erecta</i> inoculadas y sin inocular con <i>G. intrarradices</i> crecidas en macetas de 50g y en 135g	98
Figura 43. Concentración de Pb en los lixiviados de riego de plantas de <i>T. erecta</i> inoculadas y sin inocular con <i>G. intrarradices</i> crecidas en macetas de 50g y en 135g	99
Figura 44. El pH acumulativo durante el crecimiento de plantas de <i>T. erecta</i> inoculadas y sin inocular con <i>G. intrarradices</i> crecidas en macetas de 50g y en 135g	100
Figura 45. Concentración de Pb en la solución surfactante utilizada para el lavado de raíces de plantas de <i>T. erecta</i> inoculadas y sin inocular con <i>G. intrarradices</i> crecidas en macetas de 50g	101
Figura 46. Concentración de Pb en las raices de plantas de <i>T. erecta</i> inoculadas y sin inocular con <i>G. intrarradices</i> crecidas en macetas de 50g, tratadas y sin tratar con solución surfactante	102

Figura 47. Mp en μg de Pb por plantas de *T. erecta* inoculadas y sin inocular con *G. intrarradices* crecidas en macetas de 50g y en 135g 103

Tabla 1. Efectos del plomo en la sangre en la salud de los seres humanos. 13

Tabla 2. Resumen de las concentraciones elementales en suelos normales (SN) y metalíferos (o contaminados) (MS), 16

Tabla 3. Principales características para la fitoextracción de metales del suelo utilizando sistemas con ayuda química vs naturales. 25

Tabla 4. Cantidad total de Pb, Cu, Zn y Cd en los filtros después de la aplicación de 1000 mL de agua de lluvia 33

Tabla 5. Valores de densidad (g/l), pesos (g) para preparar una cantidad de 1000 g de sustrato. 52

Tabla 6. Diseño del experimento. 55

Tabla 7. Concentración de elementos adicionados a las plantas 58

Tabla 8. Diseño experimental 63

RESUMEN

Los metales pesados contribuyen fuertemente a la contaminación ambiental. Se consideran metales pesados el plomo, cadmio, cromo, mercurio, zinc, cobre, plata y arsénico, en altas concentraciones pueden resultar tóxicos para los seres vivos, tales como humanos, organismos del suelo, plantas y animales. El Pb, en el suelo, se encuentra principalmente en forma de Pb^{2+} , también es conocido su estado de oxidación +4. Algunos de los compuestos insolubles son $Pb(OH)_2$, $PbCO_3$, PbS , $PbSO_4$. La velocidad de oxidación depende de factores como la humedad, la temperatura, el pH, el potencial redox, la cantidad de materia orgánica o la roturación de los suelos. La fitorremediación es el uso de plantas para recuperar suelos contaminados, es una tecnología *in situ* no destructiva y de bajo costo. Ya que las micorrizas aumentan el área superficial de la raíz de las plantas y el plomo se acumula mayormente en las paredes celulares de la raíz. Se estudió el efecto de la simbiosis de la planta *Tagetes erecta* y el hongo micorrizico arbuscular (HMA) *Glomus intrarradices*, en la eficiencia de acumulación de plomo proveniente de fuente de plomo insoluble en forma de Pb_3O_4 . Se determinaron las variables de respuesta: colonización, área foliar (AF), biomasa, pH de lixiviados y parámetros biométricos, la concentración de Pb en raíces, brotes y lixiviados fueron medidas utilizando un Espectrofotómetro de Absorción Atómica de Flama (FAAS). Se pudo observar que existió una disminución en el AF debido a la presencia del Pb en los tratamientos, se lograron porcentajes por encima del 60% de colonización en todos los casos. La mayor concentración de plomo se encontró en la parte de las raíces para todos los tratamientos, los tratamientos micorrizados presentan un incremento en la concentración de Pb contenido en los tejidos comparado con los no micorrizados. Los tratamientos fertilizados con NO_3 presentan una mayor concentración que los fertilizados con NH_4 . Sin embargo, al haber un cambio en condiciones ambientales como la humedad y la temperatura las plantas no micorrizadas lograron remover una mayor cantidad de Pb que las micorrizadas, aun así, se demostró que la micorrización es importante, ya que con esta se ayuda a las plantas a tolerar mejor el estrés causado por el Pb y este queda más fuertemente atrapado en las raíces

debido a la afinidad que presentan los HMA la cual es mayor que la de las raíces. Además, de que, el tener un mayor volumen de sustrato para desarrollarse ayuda a incrementar la cantidad de metal extraído. Todos estos resultados obtenidos son bastante interesantes y prometedores para los fines de la fitorremediación ya que ayudan a entender cómo es el comportamiento de la planta *Tagetes erecta* y el HMA *Glomus intrarradices* y su interacción en presencia de Pb.

Palabras Claves: Plomo, Fitorremediación, *Tagetes erecta*, *Glomus intrarradices*.

SUMMARY

Heavy metals contribute heavily to pollution. Heavy metals are considered to be lead cadmium, chromium, mercury, zinc and copper, silver and arsenic. At high concentrations they can be toxic to living organisms such as humans, soil organisms, plants and animals. Pb in soil is found mainly in the form of Pb^{+2} , also known is its oxidation state +4. Some of the insoluble compounds are $Pb(OH)_2$, $PbCO_3$, PbS , $PbSO_4$. The oxidation rate depends on factors such as humidity, temperature, pH, and redox potential, the amount of organic matter or soil plowing. Phytoremediation is the use of plants to recover contaminated soils in situ it is a non-destructive technology and is low cost. Mycorrhizae increase the surface area of the plant root and lead accumulates mainly in the cell walls of the root. In this work the effect of the symbiosis of the plant *Tagetes erecta* with the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Glomus intrarradices*, the efficiency of accumulation of lead from lead source in the form of the insoluble Pb_3O_4 , has been studied. We determined the following response variables: colonization, leaf area (LA), biomass, pH of leachate and biometrics, the concentration of Pb in roots, shoots and leachate measured as by Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS). It was observed that there was a decrease in AF due to the presence of Pb in the treatments colonization rates achieved were 60% in all cases. The highest concentration of lead was found in the root for all treatments. Inoculated treatments showed an increased content of Pb in the tissues compared to the non-inoculated. Treatments fertilized with NO_3 had a higher concentration of Pb than the NH_4 fertilized one. But with a change in environmental conditions such as humidity and temperature non-mycorrhizal plants were able to remove a larger amount of Pb than the mycorrhizal plants. Even so, it shows that mycorrhization is important because this helps the plants better tolerate the stress caused by Pb and the Pb is more strongly trapped in the roots due to the greater presence of the AMF in the roots. Also, an important aspect is that a larger volume of substrate for the development and the support of the symbiotic system could possibly increase the amount of metal extracted. All these results are quite interesting and promising for phytoremediation purposes because they one help to understand the behavior of

the plant *Tagetes erecta* and the AMF *Glomus intrarradices* and their interaction in the presence of Pb.

Keywords: Lead, Phytoremediation, *Tagetes erecta*, *Glomus intrarradices*.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 INTRODUCCIÓN

A través de la historia y especialmente desde la Revolución Industrial, los hombres han producido contaminantes muy peligrosos, los cuales han sido gradualmente depositados en el ambiente. Granadillo (1993) expresó que los altos niveles de metales tóxicos no biodegradables, encontrados en sectores urbanos, son el resultado de la actividad antropogénica. En este contexto, se tiene conocimiento que en la antigüedad, el plomo era común y probablemente fue usado primero con propósitos cosméticos y para hacer adornos (Aitcheson, 1960).

No solamente los romanos y egipcios usaron el plomo sino que también lo hicieron los antiguos griegos. Geólogos franceses han descubierto que la nieve que cayó durante el tiempo de la dominación griega, contenía una inesperada alta concentración de plomo. El monto de plomo precipitado de la atmósfera entre el año 500 A.C. y el 300 D.C. representó un 15% de la contaminación causada en este siglo por la gasolina. Hay evidencias de su uso en China y en México precolombino (Emsley, 1994).

En tiempos más recientes, el desarrollo de procesos industriales usando plomo ha sido extraordinario y, a pesar de las evidencias de envenenamientos, todavía está siendo usado en el ámbito mundial. El uso del plomo se ha incrementado considerablemente en este siglo y continúa haciéndolo, por lo que es importante valorar el efecto que esta desproporcionada movilización del metal está teniendo en sus niveles ambientales. A pesar de las medidas tomadas para evitar o controlar la polución con plomo, los seres humanos siempre han estado expuestos al plomo, pero los registros de envenenamiento se han incrementado sustancialmente en décadas recientes como un producto de la industrialización. En consecuencia, hay la necesidad de reducir significativamente el contaminante del ambiente y controlar la exposición de los seres humanos a su toxicidad. La contaminación del ambiente es creciente en las sociedades industrializadas (Aranguren, 1999).

1.2 METALES PESADOS EN EL AMBIENTE 7

Los metales pesados contribuyen fuertemente a la contaminación ambiental, la cantidad de metales disponibles en el suelo depende de la solubilidad, la cual está influenciada por el pH, el contenido de arcillas, contenido de materia orgánica, la capacidad de intercambio catiónico y otras propiedades que hacen que los sitios contaminados con metales pesados sean únicos en términos de manejo de la contaminación (Sauve *et al.*, 2000). Además son definidos como elementos con propiedades metálicas (conductibilidad, ductilidad, etc.), número atómico mayor de 20, y cuya densidad es mayor a los 5g/cm³. Se consideran metales pesados: el plomo, cadmio, cromo, mercurio, zinc, cobre, plata y arsénico; constituyendo estos un grupo de gran importancia, ya que algunos son esenciales para las células, pero en altas concentraciones pueden resultar tóxicos para los seres vivos, tales como humanos, organismos del suelo, plantas y animales (Spain *et al.*, 2003).

Estos contaminantes pueden alcanzar niveles de concentración que provocan efectos negativos en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo como son: la reducción del contenido de materia orgánica; disminución de nutrimentos; variación en el pH, generando suelos ácidos; efectos adversos en la diversidad y actividad en los microorganismos de la rizósfera; dificultan la formación de una cubierta vegetal protectora, favoreciendo con ello la aridez, erosión del suelo y la dispersión de los contaminantes hacia zonas y acuíferos adyacentes y como consecuencia aumenta la vulnerabilidad de las plantas al ataque por insectos, plagas y enfermedades, afectando su desarrollo (Zhang *et al.*, 2000).

Las principales fuentes de metales pesados son actividades naturales, como desgastes de cerros y volcanes, las cuales constituyen una parte relevante de los metales pesados en el suelo, así como también actividades antropogénicas como la industria minera que está catalogada como una de las actividades industriales más generadora de metales pesados (Pineda, 2004).

Dentro de los metales pesados podemos hacer una clasificación dividiéndolos en dos grupos: oligoelementos o también conocidos como micronutrientes, los cuales son los requeridos en pequeñas cantidades o cantidades traza por plantas y animales debido a que son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital, pasado cierto umbral se vuelven tóxicos y son el As, B, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Fe, Se y Zn; y metales pesados sin función biológica conocida, cuya presencia en determinadas cantidades en seres vivos lleva apareja disfunciones en el funcionamiento de sus organismos, resultan altamente tóxicos, presentan la propiedad de acumularse en los organismos vivos y son el Cd, Hg, Pb, Sb, Bi, Sn, Tl (García y Dorronsoro, 2005).

Cuando el contenido de metales pesados en el suelo presenta niveles que rebasan los límites máximos permitidos causan efectos inmediatos como inhibición del crecimiento y el desarrollo de las plantas, y un disturbio funcional en otros componentes del ecosistema, así como la disminución de las poblaciones microbianas del suelo. El término que se usa o se emplea para definir este tipo de perturbaciones es “polución de suelos” (Martín, 2000).

En el suelo, los metales pesados están presentes como iones libres, compuestos metálicos solubles, compuestos insolubles como óxidos, carbonatos e hidróxidos. Su acción directa sobre los seres vivos ocurre a través del bloqueo de las actividades biológicas, es decir, la inactivación enzimática por la formación de enlaces entre el metal y los grupos –SH (sulfhidrilos) de las proteínas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos. La contaminación en suelos por metales pesados ocurre cuando estos son irrigados con aguas procedentes de desechos de minas, aguas residuales contaminadas de parques industriales y municipales y filtraciones de presas de jales (Wang *et al.*, 1992).

El pH es un factor esencial para definir la movilidad de los metales pesados. La mayoría de estos elementos tienden a estar más disponibles en un pH ácido, excepto As, Mo, Se y Cr, los cuales tienden a estar más disponibles a pH alcalino. En medios con pH moderadamente alto se produce la precipitación como hidróxidos y en medios muy alcalinos pueden nuevamente pasar a la solución como hidroxicomplejos. La adsorción de los metales pesados en las partículas de suelo también está fuertemente condicionada por el pH y por tanto, también su biodisponibilidad de sus compuestos (Alloway, 1995).

La materia orgánica puede adsorber tan fuertemente a algunos metales, como es el Cu, que pueden quedar en forma no disponible para las plantas, motivo por el cual, algunas plantas crecidas en suelos ricos en materia orgánica, presentan carencia de elementos como el Cu, Zn, eso no significa que por el hecho de no estar biodisponibles para ser tomados por las plantas, dichos suelos no estén aun contaminados, ya que las poblaciones microbianas se reducen notablemente. La estructura del suelo puede cambiar por la presencia de contaminación de metales pesados en el suelo, por ejemplo la arcilla tiende a adsorber a los metales pesados, que quedan retenidos en sus posiciones de cambio, por el contrario los suelos arenosos carecen de capacidad de fijación de los metales pesados, los cuales pasan rápidamente al subsuelo y pueden contaminar los niveles freáticos (Pineda, 2004).

1.2.1 Movilización de Metales Pesados en el Suelo ²

La contaminación del suelo por metales pesados está fundamentalmente relacionada con diferentes tipos de actividades humanas. Una vez en el suelo, éstos pueden quedar retenidos en éste, pero también pueden ser movilizados en la solución del suelo mediante diferentes mecanismos biológicos y químicos (Pagnanelli *et al.*, 2004). Los metales pesados adicionados a los suelos se redistribuyen y reparten lentamente entre los componentes de la fase sólida. Dicha redistribución se caracteriza por una rápida retención inicial y posteriores reacciones lentas, dependiendo de las especies del metal, propiedades del suelo, nivel de introducción y tiempo (Han *et al.*, 2003).

La movilidad relativa de los elementos traza en suelos es de suma importancia en cuanto a su disponibilidad y su potencial para lixiviarse de los perfiles del suelo al agua subterránea y difiere de si su origen es natural o antrópico y, dentro de este último, al tipo de fuente antrópica (Burt *et al.*, 2003).

Los factores que influyen en la movilización de metales pesados en el suelo son: a) las características del suelo: pH, potencial redox, composición iónica de la solución del suelo, capacidad de intercambio, presencia de carbonatos, materia orgánica, textura; b) naturaleza de la contaminación: origen de los metales y forma de deposición y c) condiciones medioambientales: acidificación, cambios en las condiciones redox, variación de temperatura y humedad (Sauquillo *et al.*, 2003).

En general, los metales pesados incorporados al suelo pueden seguir cuatro diferentes vías: quedan retenidos en el suelo, ya sea disueltos en la fase acuosa del suelo, ocupando sitios de intercambio o específicamente adsorbidos sobre constituyentes inorgánicos del suelo, asociados con la materia orgánica del suelo y/o precipitados como sólidos puros o mixtos; pueden ser absorbidos por las plantas y así incorporarse a las cadenas tróficas; pasan a la atmósfera por volatilización y se movilizan a las aguas superficiales o subterráneas (García y Dorronsoro, 2005).

Para elucidar el comportamiento de los metales pesados en los suelos y prevenir riesgos tóxicos potenciales se requiere la evaluación de la disponibilidad y movilidad de los mismos (Banat *et al.*, 2005). La toxicidad de los metales depende no sólo de su concentración, sino también de su movilidad y reactividad con otros componentes del ecosistema (Abollino *et al.*, 2002).

1.3 PLOMO (Pb)

El plomo se ubica en el grupo IVA (metales) en la tabla periódica. El Pb es un metal gris azulino que se presenta en forma natural y en pequeñas cantidades (0.002%) en la corteza terrestre. Este elemento, es generalmente obtenido de la galena (PbS), la anglesita (PbSO₄) y la curositita (PbCO₃). El Pb es tóxico para el sistema nervioso y se asocia con la depresión de muchas funciones endócrinas, aunque no hay evidencia de efectos teratogénicos o carcinogénicos. El uso más amplio del Pb elemental es para la fabricación de acumuladores; también es usado para la fabricación de tetra-etilo de plomo, pinturas, cerámicas, forros para cables, elementos de construcción, vidrios especiales, pigmentos, soldadura suave y municiones (ATSDR, 2005).

El Pb, en el suelo, se encuentra principalmente en forma de Pb²⁺, también es conocido su estado de oxidación +4. Algunos de los compuestos insolubles son Pb(OH)₂, PbCO₃, PbS, PbSO₄. La velocidad de oxidación depende de factores como la humedad, la temperatura, el pH, el potencial redox, la cantidad de materia orgánica o la roturación de los suelos (Guitart, 2005).

1.3.1 Fuentes de Contaminación de Pb en México

Este elemento es una de las bases de la civilización tecnológica, ya que infinidad de industrias lo utilizan como materia prima o como componente básico de sus productos. El intenso uso de este metal se debe a una serie de propiedades que lo hacen poco menos que imprescindible en algunas industrias. Entre estas propiedades las más importantes son: densidad elevada, punto de fusión bajo, inercia química entre los ácidos, ductilidad, muchas de sus sales son corrosivas y algunas de sus sales son fuertemente tóxicas. La contaminación natural por plomo es pequeña. La contaminación artificial, es decir aquella procedente de la actividad humana es grande. Dos son las principales fuentes: emisiones industriales (fundiciones de hierro, zinc, cobre, y plomo; fábricas de pinturas, cerámicas, cristalería, pólvoras y explosivos; combustión del carbón etc.) y emisiones producidas por los vehículos.

En la última década se restringió el contenido de plomo de las gasolinas, para reducir así las emisiones a la atmósfera (Seoánez, 1999). La industria minera, es otra fuente importante de contaminación, en México ha generado por décadas una gran cantidad de desechos y sitios contaminados a lo largo de todo el país. La excavación de minas, la remoción de minerales, el proceso y la extracción de metales puede causar daños ambientales y, en casos extremos, destruir el ecosistema; por ejemplo, se pueden dañar tierras de cultivo, favorecer la erosión y contaminar cuerpos de agua con sales solubles de elementos potencialmente tóxicos (EPT), como As, Se, Pb, Cd y óxidos de S, entre otros. Asimismo, el material subterráneo puede generar volúmenes de residuos hasta ocho veces superiores al original (Volke *et al.*, 2005).

En la región lagunera de México se ha detectado y reportado una alta contaminación de plomo en el suelo y aire. La presencia de metales pesados y particularmente plomo genera un grave problema y representa un gran riesgo dado que las condiciones ambientales de dicha zona propician suelos secos y fuertes vientos que generan tolvaneras, las cuales dispersan el suelo y sus contaminantes en toda la región, provocando riesgos de salud en la población

humana. Por ejemplo, el problema en la ciudad de Torreón Coahuila es provocado por el plomo, el cadmio y el arsénico, tres elementos altamente dañinos para los humanos. Sin embargo, los estudios, las denuncias y ahora las acciones que se han realizado en torno a este problema tienen como actor principal al plomo. Esto no significa que el plomo sea el más tóxico de los tres elementos –de hecho ocurre lo contrario- sino a que de los tres es el que ha sido utilizado por la humanidad más ampliamente y por ende es el que causa más problemas y más preocupación en todo el mundo. El envenenamiento por metales pesados se debe al funcionamiento de la cuarta fundidora más importante del mundo, propiedad de la compañía Peñoles, situada en el centro de la ciudad de Torreón. En otros lugares puede presentarse la contaminación por plomo pero las fuentes emisoras pueden ser distintas (Valdés, 1999).

Además de las emisiones, hay un problema muy grave con las escorias de los procesos de esta planta; desde el inicio de sus actividades éstas se han ido acumulando en un montículo conocido localmente como “el cerro negro”. Dicha empresa es la responsable de emitir altos índices de agentes contaminantes y que a la fecha sigue generando elevados niveles de plomo y cadmio entre otros contaminantes dañinos para el medio ambiente y para la salud de adultos y menores, como parte de los procesos industriales y metalúrgicos que en esa empresa se desarrollan. La intoxicación que se hace patente en el Municipio de Torreón es grave provocando, en menores graves e irreversibles daños a su sistema nervioso central y periférico, pues se sabe que el plomo como principal causa de intoxicación en Torreón se absorbe por ingestión o por inhalación, este, al contacto con la sangre y niveles altos de plomo se puede provocar encefalopatía e incluso la muerte. Los valores detectados de plomo en la sangre, aire y suelo en esta zona son elevados y sobrepasan los valores permisibles en normas nacionales e internacionales.

1.3.2 Efecto del Plomo en la Salud

El plomo es un elemento que no cumple ninguna función vital en el organismo humano y que resulta tóxico incluso en pequeñas dosis. Puede afectar a casi todos los órganos y sistemas en el cuerpo. El más sensible es el sistema nervioso, tanto en niños como en adultos. Los efectos del plomo en la salud de los niños pueden incluir problemas de comportamiento y de aprendizaje (hiperactividad), crecimiento atrasado, problemas auditivos, dolores de cabeza y daño al cerebro y al sistema nervioso central. Los adultos expuestos al plomo pueden sufrir de problemas reproductivos, presión sanguínea alta, trastornos digestivos, dolor en los músculos y en las coyunturas, problemas de memoria y de concentración y trastornos nerviosos (**Tabla 1**) (Matte, 2003).

Síntomas	Nivel de plomo en la sangre
Parto prematuro, bajo peso al nacer, problemas de desarrollo y aprendizaje	10 a 15 µg/dL
Cocientes intelectuales (IQ) reducidos	25 µg/dL
Reflejos más lentos	30 µg/dL
Menos glóbulos rojos en la sangre	40 µg/dL
Problemas nerviosos, anemia, cólicos	70 µg/dL
Problemas estomacales y renales	90 µg/dL
Problemas cerebrales	100 µg/dL
<i>Estos efectos sobre la salud empiezan a los niveles indicados pero no todos los niños los sufren.</i>	

Tabla 1. Efectos del plomo en la sangre en la salud de los seres humanos. Fuente: Departamento de Salud de Tejas (<http://www.tdh.state.tx.us/lead/childbody.htm>)

El plomo se fija a las enzimas y altera la estructura y función de muchas proteínas, interfiriendo así con la acción y la finalidad de muchos tipos diferentes de células del cuerpo. Estos cambios pueden ocasionar daños permanentes a los órganos en crecimiento y en desarrollo, en especial al sistema neurológico de los niños y es muy difícil revertir los efectos. El plomo penetra en el cuerpo no sólo por vía oral, sino también por las vías respiratorias. Los niños que viven cerca de una fundición de plomo o una planta manufacturera de baterías para vehículos corren el gran riesgo de quedar expuestos a la toxicidad de ese elemento (Buka, 2001).

1.3.3 Plomo en el Ambiente

Desde hace algunas décadas, la presencia del plomo como contaminante ecotoxicológico ha sido bien conocida. Así, el impacto de los metales pesados de origen antropogénico en el ambiente, ha sido objeto de estudio en varias investigaciones. El plomo (Pb) se considera un contaminante ecotoxicológico ya que su uso provoca contaminación ambiental, debido a la cual, existe una gran exposición de los humanos al mismo. La principal vía de biodisponibilidad son el suelo y el polvo, donde se concentra y por medio del cual ingresa a los organismos (**Figura 1**). El manejo inadecuado de materiales con Pb ha sido causante de numerosos problemas ambientales en todo el mundo; sin embargo, no todo el Pb del suelo presenta el mismo grado de movilidad o biodisponibilidad. La distribución química del Pb en el suelo depende del pH, de los minerales, de la textura, materia orgánica, así como de la naturaleza de los compuestos de Pb contaminantes. El suelo es uno de los mayores reservorios en los cuales se acumula la contaminación ambiental (Alloway, 1995).

Más del 90% de la contaminación ambiental producida es retenida en las partículas de suelo y cerca del 9% es interceptada en los sedimentos acuáticos. Particularmente, la contaminación de un suelo con Pb es de preocupación ya que este metal tiene un alto tiempo de residencia en el suelo, estableciéndose un equilibrio dinámico con la hidrosfera, atmósfera y biosfera y de esta forma alterando el ecosistema, incluyendo al ser humano (Huang, 1999).

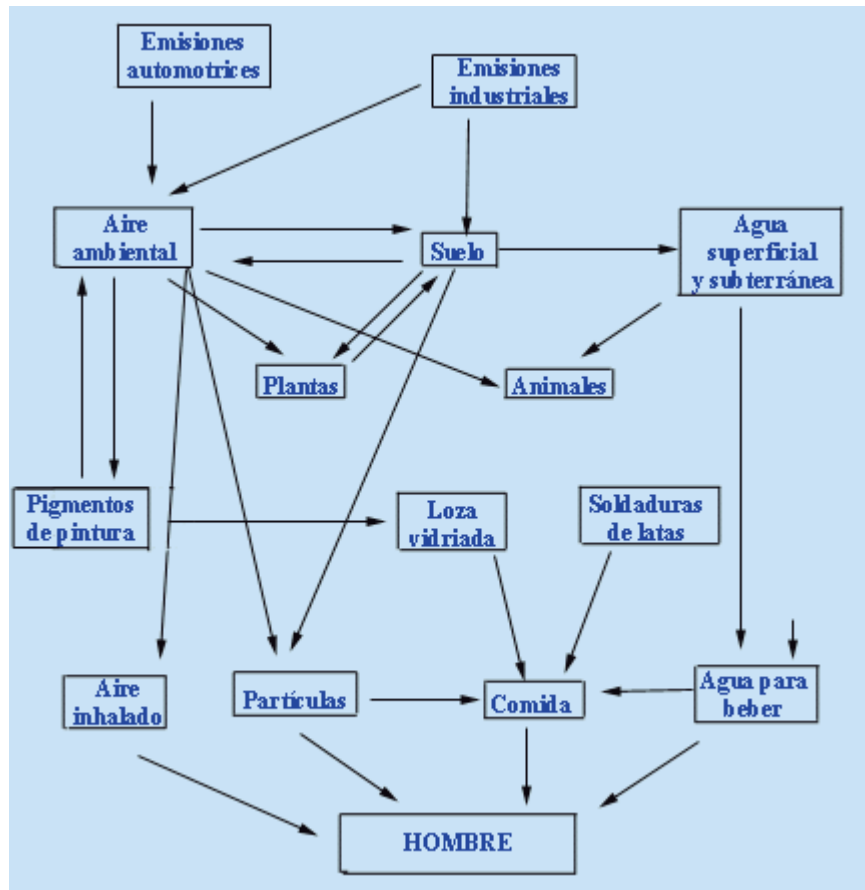


Figura 1. Esquema de Exposición Humana al Plomo y Cadena de Difusión

En virtud de que los elementos contaminantes pueden estar presentes en el suelo de manera natural y en ocasiones en concentraciones tales que pueden representar un riesgo para la salud de la población humana o de los ecosistemas, es importante establecer criterios para determinar la contaminación antropogénica en suelos y en su caso las concentraciones de remediación. Existen límites máximos permisibles para suelos contaminados por arsénico, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plomo, selenio, talio y/o vanadio (**Tabla 2**). Cuando al menos una de las concentraciones de estos elementos se encuentra por arriba de los límites máximos permitidos es necesario implementar acciones de remediación.

Elemento	Nivel en suelos normales(ppm)	Nivel en suelos metalíferos (ppm)	Carga crítica en el suelo (ppm)	límite CCE (ppm)	Límite EPA (ppm)	Límite NOM Uso en riego agrícola (mg/lt)
As	2.2-25	1519	-	-	0.01	0.2
Cd	0.06-1.1	317	1.10	0.5	0.005	0.05
Cr	7-221	3450	64.41	1.5	0.100	0.5
Cu	6-80	3783	48.78	50	1.3	4.0
Hg	0.02-0.41	12000	0.56	1.5	0.002	0.005
Ni	4-55	11260	54.64	1	0.7	2.0
Pb	10-84	49910	75.68	5	0.0015	5.0
Se	0.01-0.09	>50	-	-	0.05	-
Zn	17-125	7480	207.32	150	5	10.0

Tabla 2. Resumen de las concentraciones elementales en suelos normales (SN) y metalíferos (o contaminados) (MS), la carga crítica en el suelo (CLS) sobre la cual el ecosistema es afectado de forma adversa y los límites máximos permisibles dictados por la Commission des Communautés Européenes (EU), la Environmental Protection Agency (EPA) y la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.

1.3.4 Toxicidad del Pb en Plantas 7

Los síntomas visuales de la toxicidad por Pb son la rápida inhibición del crecimiento de la raíz, crecimiento de la planta y clorosis (Burton *et al.*, 1984). Sin embargo, cuando el Pb entra dentro de las células en pequeñas cantidades genera un gran rango de efectos adversos en los procesos fisiológicos. Una vista general de la toxicidad del plomo en plantas nos muestra que este causa una inhibición de la actividad enzimática, disturbios en la nutrición mineral, desequilibrio hídrico, cambios en el estado hormonal y alteraciones en la permeabilidad de la membrana. Estos desordenes trastornan las actividades fisiológicas normales de la planta. En altas concentraciones de Pb las células pueden llegar a morir (Ernest, 1998; Seregin y Ivanov, 2001).

A nivel celular el plomo influye fuertemente en la actividad enzimática de diferentes rutas metabólicas, en enzimas que contienen el grupo sulfhidrilo (-SH) que es un grupo necesario para la actividad de estas. Lo anterior debido a que el Pb se liga a estos grupos funcionales (Van Assche y Clijsters, 1990).

También el proceso de fotosíntesis es afectado por la toxicidad del Pb. Las plantas expuestas a iones de plomo muestran un declive en la tasa fotosintética, el cual resulta por un disturbio en la ultraestructura de los cloroplastos; una moderada síntesis de clorofila, plastoquinonas y carotenoides; una obstrucción en el transporte electrónico, una inhibición en el ciclo enzimático de Calvin, así como la deficiencia de CO₂ como resultado del cierre estomático (Rebechini y Hanzely, 1974). El plomo inhibe la síntesis de clorofila porque afecta de la toma de elementos esenciales como Mg y Fe por las plantas (Burzynski, 1987). Este mecanismo de daño fotosintético es debido a la afinidad del plomo por los ligandos N- y S- en las proteínas (Ahmed y Tajmir-Riahi, 1993).

El plomo ejerce un significativo efecto en la tasa de transpiración y contenido de ATP en los organismos fotosintéticos (Reese y Roberts, 1985). En plantas que crecen bajo estrés por plomo, el contenido de agua en los tejidos y la transpiración disminuye. Se han propuesto varios mecanismos para explicar la

inducción de la disminución de la tasa de transpiración y contenido de agua por el Pb. Uno de estos es el propuesto por Iqbal y Moshtaq (1987) el cual explica la disminución debido a que el tratamiento con Pb en plantas causa disminución de crecimiento, el cual resulta en una reducción en el área foliar que es el mayor órgano de transpiración.

Altas concentraciones de plomo en el suelo, causan un desequilibrio de nutrientes minerales en el crecimiento de las plantas. Muchas de las acciones del plomo observadas aparentemente son el resultado indirecto del desequilibrio mineral en los tejidos de la planta. Cambios significativos en los contenidos de nutrientes ocurren en las plantas bajo estrés por plomo (Kabata-Pendias and Pendias, 1992). En la mayoría de los casos el Pb bloquea la entrada por las raíces de cationes de K, Ca, Mg, Mn, Zn, Cu, Fe y de aniones como NO₃ (Sharma y Dubey, 2005).

Dos mecanismos han sido propuestos para explicar la disminución de la toma de micro y macro nutrientes bajo condiciones de toxicidad por Pb. El primero mecanismo “físico” basado en el tamaño del radio del ion metálico y segundo “químico” basado en el trastorno de metal inducido en el metabolismo celular que produce cambios en la estructura y la actividad enzimática de la membrana. (Sharma y Dubey, 2005).

Uno de los efectos fitotóxicos del plomo es la inducción del estrés oxidativo en el crecimiento de las partes de la planta debido al aumento de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) que resulta en un desequilibrio en el estado redox celular. El plomo induce la producción de ROS en las plantas y la producción de estos depende de la intensidad del estrés, el periodo de duración, edad y especie de la planta (Asada, 1994; Chaintya and Naithani, 1994; Verma and Dubey, 2003).

1.3.5 Tolerancia al plomo en plantas 2

Baker en 1981 sugirió las dos estrategias básicas para la toma de metales relacionadas con la tolerancia de las plantas:

- Estrategia “exclusora”. La concentración del metal pesado en la planta es mantenida a bajos niveles restringiendo el transporte del metal.
- Estrategia “acumuladora”. El metal es acumulado en los tejidos de la planta por encima de la concentración del metal en el suelo, esto implica una alta especificidad de la planta por el metal.

Existen tres estrategias básicas de respuesta por las células propuestas por Berry (1986), estas son: evasión, desintoxicación y tolerancia química, cada una de las cuales afecta los tejidos de diferentes formas.

En la mayoría de los casos, la concentración de plomo en las raíces es mucho mayor a la encontrada en las partes aéreas (Kumar *et al.*, 1995). Estudios de extracción de plomo con plantas han demostrado que las raíces tienen la habilidad de extraer cantidades significativas de plomo (Lane and Martin, 1977). La captura de plomo a través de las hojas depende de la capacidad que tengan estas para absorberlo de la atmosfera, es decir, depende específicamente de la morfología de las hojas y por consiguiente del tipo de planta (Godzik, 1993).

El tamaño de las partículas del suelo, la capacidad de cambio catiónico, el área superficial de la raíz, exudados de la raíz, micorrización y velocidad de transpiración son algunos de los factores que afectan la capacidad de extracción del plomo (Davies, 1995). La absorción del plomo en el suelo sigue la ecuación de Langmuir e incrementa con el aumento del pH en el rango de 3 a 8.5 (Lee *et al.*, 1998).

La retención de plomo en las raíces está basada en la unión del plomo a los sitios de intercambio iónico en la pared celular y la precipitación extracelular, principalmente en forma de carbonato de plomo depositado en la pared celular.

1.4 FITORREMEDIACIÓN

Por todo lo anterior surge la necesidad de remediar todos los sitios contaminados por plomo para lo cual existen dos tipos de tecnologías: tecnologías convencionales de remediación ambiental que implican excavación o remoción, o la estabilización o conversión química *in situ* de residuos peligrosos, que son costosas y a menudo implica la destrucción secundaria del ambiente (McIntyre, 2003) y la fitorremediación que se presenta como una tecnología que puede llegar a ser sustentable.

El concepto de usar plantas para limpiar suelos contaminados no es nuevo, desde hace 30 años las plantas fueron propuestas para el uso en el tratamiento de aguas residuales. En Rusia en los años sesentas se realizaron investigaciones utilizando plantas para recuperar suelos contaminados con radionucleótidos. Existen reportes sobre el empleo de plantas acuáticas en aguas contaminadas con plomo, cobre, cadmio, hierro y mercurio. La remediación de la acumulación de metales pesados en suelos utilizando plantas es también ampliamente reconocida (Ernst, 2000).

La fitorremediación es el uso de plantas para recuperar suelos contaminados, es una tecnología *in situ* no destructiva y de bajo costo y está basada en la estimulación de microorganismos degradadores. (Merkl *et al.*, 2005). Consiste en el uso de plantas, sus microorganismos o enzimas asociadas, así como de la aplicación de técnicas agronómicas para degradar, retener o reducir a niveles inofensivos los contaminantes ambientales a través de procesos que logran recuperar la matriz o estabilizar al contaminante. Dentro de las técnicas de restauración de suelos afectados por la contaminación, la fitorremediación ha adquirido auge por ser un procedimiento pasivo, estéticamente agradable, útil para remediar simultáneamente una gran variedad de contaminantes (Frick *et al.*, 1999).

En estudios recientes se ha demostrado que la fitorremediación es una solución prometedora para la limpieza de sitios contaminados por una variedad de metales, aunque también tiene una serie de limitaciones entre las cuales destaca el tiempo de tratamiento (Singh *et al.* 2003), ya que es un proceso de descontaminación que involucra el empleo de plantas con las cuales se pueden remover, transferir, estabilizar, descomponer y/o degradar contaminantes de suelo, sedimentos y agua, como solventes, plaguicidas, hidrocarburos poliaromáticos, metales pesados, explosivos, elementos radiactivos, fertilizantes, los cuales deben de estar biodisponibles para la planta (McGrath *et al.*, 2001).

Una comparación en cuanto a costos presentada por Enseley (2000) nos muestra que los costos estimados de la remediación de suelos contaminados con plomo mediante el uso de técnicas convencionales como excavación y la confinación del suelo contaminado tiene un costo aproximado de \$150 a \$350 dólares por tonelada de suelo tratado, mientras que utilizando la fitorremediación el costo aproximado disminuye considerablemente hasta \$20 a \$80 dólares por tonelada de suelo remediado.

Por todo lo anterior, la fitorremediación se presenta como una tecnología sustentable que puede ser aplicada para la remediación de sitios contaminados.

En la actualidad, se consideran seis opciones principales de la fitorremediación: fitoextracción, fitoestabilización, rizofiltración, Fitodegradación, degradación rizosférica y Fitovolatilización (**Figura 2**).

1.4.1 Fitodegradación

En la Fitodegradación, los agentes contaminantes son del tipo orgánicos, los cuales son convertidos por las enzimas internas de la planta o las secretadas por la raíz, en compuestos con toxicidad reducida (Suresh y Ravishankar, 2004).

Por ejemplo, existen reportes donde el tricloroetileno (TCE) es absorbido por árboles híbridos de álamo (*Populus deltoides x nigra*) y degradado hasta sus componentes metabólicos, obteniendo como productos finales dióxido de carbono, ion cloruro y agua (Newman *et al.*, 1997; Schnoor *et al.*, 1995). También se ha demostrado que los álamos absorben 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX), octahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocina (HMX) y los transforma parcialmente (Yoon *et al.*, 2002).

También los exudados de la raíz de *Datura innoxia* y *Lycopersicon peruvianum* que contienen peroxidasa, lacasa y nitrilasa, han demostrado tener la capacidad de degradar contaminantes del suelo (Lucero *et al.*, 1999) y la nitroreductasa y lacasa juntas, pueden desintegrar TNT, RDX y HMX (Schnoor *et al.*, 1995).

Una vez que estos compuestos se rompen en moléculas más pequeñas las plantas pueden entonces incorporar estos componentes o pueden quedar como componentes orgánicos del suelo, los cuales ya no se consideran como peligrosos.

1.4.2 Degradación rizosférica

La diferencia entre la degradación rizosférica y la Fitodegradación consiste en que en el primer caso, la degradación es realizada por enzimas, secretadas por colonias microbianas que existen en la rizósfera. Los contaminantes orgánicos degradados se volatilizan a la atmósfera o son incorporados en las matrices del suelo. La eficacia de las colonias microbianas en esta actividad depende del tipo de raíces de la planta disponibles en la rizósfera. Las plantas con grandes tasas de transpiración como las gramíneas o con grandes densidades de raíz como las leguminosas, especialmente la alfalfa, permiten la aireación del mismo, lo que estimula la actividad microbiana. Estas plantas, así como, aquellas cuyos exudados de la raíz facilitan el crecimiento microbiano, permiten la oxidación catalizada por enzimas microbianas de los residuos químicos orgánicos (Narayanan, 1998; Pieper *et al.*, 2004).

1.4.3 Rizofiltración

La rizofiltración elimina contaminantes de las corrientes residuales, tales como los drenajes agrícolas, descargas industriales y desechos procesados de materiales nucleares (Suresh y Ravishankar, 2004) usando raíces de plantas sumergidas como dispositivo de filtración. En un estudio realizado en el área de la bahía de San Francisco se utilizó un pantano construido al lado de la bahía con una combinación de plantas acuáticas, como *Schoenoplectus robustus* (espadaña robusta), *Distichlis spicata* (pasto salado), entre otras y fue posible remover el 89% de selenio del agua residual contaminada con selenita, arrojada por las refinerías de petróleo cercanas (Hansen, 1998).

Numerosos procesos simultáneos y simbióticos entre la flora y la fauna acuáticas, son responsables de la última inmovilización o degradación del contaminante donde el proceso físico que ocurre en la raíz de las plantas, es la adsorción y la absorción. Las plantas con gran área superficial de raíz, facilitan estos procesos (Stottmeister *et al.*, 2003).

1.4.4 Fitovolatilización 2

Las plantas pueden remover sustancias tóxicas del suelo, por medio de la Fitovolatilización. En este proceso, los componentes solubles son tomados con el agua por las raíces, transportados a las hojas y volatilizados a través de las estomas a la atmósfera. El mejor ejemplo de este proceso es la volatilización del ion mercurioso/mercúrico y la conversión al mercurio elemental (Hg) por *Arabidopsis* transgénica y *Populus* amarillos que contenían reductasa mercúrica bacteriana (*merA*) (Rugh *et al*, 1998). La cantidad de contaminante volatilizado, es proporcional a la tasa de transpiración, la cual depende de la magnitud del flujo de agua a través de la planta.

El metil terciario butil éter (MTBE), es un aditivo en la gasolina que contamina con frecuencia el agua subterránea. Rubin y Ramaswami (2001) demostraron que los árboles jóvenes de álamo, pueden concentrar 100 ppb y transpirar MTBE, que permite una reducción del 30% de la masa de MTBE en soluciones hidropónicas que contienen altas (1600 ppb) y bajas (300 ppb) concentraciones del contaminante. Esto sugiere un posible uso de álamos híbridos, para la remoción de orgánicos tales como MTBE del agua subterránea.

1.4.5 Fitoextracción 2

La fitoextracción es la remoción de toxinas, particularmente metales pesados y metaloides, por las raíces de las plantas con el subsiguiente transporte a los órganos aéreos de la planta (Salt *et al.*, 1998) (Figura 2). Los agentes contaminantes acumulados en los tallos y hojas son cosechados y retirados del sitio junto con otros residuos de las plantas. La fitoextracción puede ser dividida en dos clases: continua e inducida (SALT *et al*, 1998). La fitoextracción continua requiere el uso de plantas que acumulan altos niveles del contaminante tóxico durante toda su vida (hiperacumuladores), mientras que los métodos de fitorremediación inducida, realzan la captura de la toxina en un tiempo corto, agregando agentes de aceleración o quelantes al suelo.

La fitoextracción debe considerarse como una tecnología de largo plazo, que puede requerir de varios ciclos de cultivo para reducir la concentración de los contaminantes a niveles aceptables. El tiempo requerido depende de la concentración y tipo de contaminante(s), de la duración del periodo de crecimiento y de la eficiencia de remoción de la especie utilizada y puede tomar entre uno y 20 años (Prasad y Freitas, 2003).

Esta técnica se encuentra todavía en su etapa inicial de investigación y de desarrollo, el número de pruebas de campo realizadas hasta la fecha es aún pequeña (Brown *et al.*, 2003) y está surgiendo como un método de rehabilitación atractivo debido a su fácil manejo, además su costo es relativamente bajo. Esta opción de limpieza depende principalmente, de las condiciones del suelo y de la planta acumuladora (Pulfort y Watson, 1993). Para mejorar el proceso de fitoextracción, la biodisponibilidad del contaminante hacia las raíces puede facilitarse a través de la adición de agentes acidificantes, de fertilizantes o quelantes (Prasad y Freitas, 2003).

En el caso de los metales pesados, los quelantes como EDTA favorecen la solubilización de metales en el suelo y la acumulación subsecuente en el tejido de las plantas. Se han efectuado tratamientos con EDTA para la acumulación de plomo (Pb), cadmio (Cd), cromo (Cr), níquel (Ni) y zinc (Zn) en *Brassica juncea* (mostaza india) y *Helianthus annuus* (girasol), sin embargo, puede haber ciertos riesgos asociados a algunos tipos de quelantes, debido al alto grado de solubilidad en agua de ciertos complejos quelante-toxina. Esto podría dar lugar al movimiento de los complejos a capas más profundas del suelo, dando por resultado la contaminación del agua subterránea (Wu *et al.*, 1999; Lombi *et al.*, 2001). Las características de las plantas con y sin tratamiento químico se comparan en la **Tabla 3**.

Con ayuda Química	Al Natural
Plantas no acumuladoras de metales	Plantas hiperacumuladoras de metales
Rápido crecimiento y alta biomasa	Poco crecimiento y poca biomasa
Quelantes sintéticos y ácidos orgánicos son usados para aumentar la extracción del metal	Habilidad natural para extraer grandes cantidades de metales del suelo
Incrementa la transferencia del metal de las raíces a las hojas	Eficiente traslocación de metales de la raíz a las hojas
Baja tolerancia a metales; el incremento de la absorción produce la muerte de la planta	Alta tolerancia; sobrevivencia con altas concentraciones de metal en los tejidos

Tabla 3. Principales características para la fitoextracción de metales del suelo utilizando sistemas con ayuda química vs naturales.

1.4.6 Fitoestabilización

La fitoestabilización consiste en el uso de plantas que inmovilizan el metal contaminante en la rizósfera. La erosión y la lixiviación pueden separar los contaminantes presentes en el suelo y al quedar libres éstos pueden causar la subsiguiente contaminación del aire o del agua. Plantas que son tolerantes a los metales pesados y desarrollan un extenso sistema de raíces son de interés para la fitoestabilización ya que la adherencia de los contaminantes a las raíces de estas plantas o su precipitación en el suelo por la acción de los exudados de la raíz, reduce la disponibilidad de contaminantes libres. También, las plantas que crecen en suelos contaminados proporcionan una cubierta y forman agregados del suelo, evitando así la acción erosiva del viento y del agua y el contacto directo de animales con los contaminantes. Al respecto, numerosos proyectos de fitoestabilización se han emprendido en Francia y los Países Bajos (Marseille *et al.*, 2000; Bouwman *et al.*, 2001). Las plantas con altas tasas de transpiración, por ejemplo las hierbas pertenecientes a la familia *Juncaceae*, las plantas forrajeras y las cañas son útiles para la fitoestabilización, disminuyendo la cantidad de agua

subterránea que fluye del sitio que lleva los contaminantes (Suresh y Ravishankar, 2004). Combinando estas plantas con árboles perennes y leñosos, con raíces profundas o con alta densidad (álamos, chopos) para formar agregados en el suelo para evitar la erosión por el viento, pueden ser una estrategia eficaz (Berti y Cunningham, 2000).

La fitorremediación aplicada a suelos contaminados con elementos o compuestos inorgánicos, incluye, básicamente, tres de estos mecanismos: la fitoextracción o fitoacumulación, la fitoestabilización y la fitovolatilización (**Figura 2**) (Singh *et al.*, 2003, Prasad y Freitas 2003).

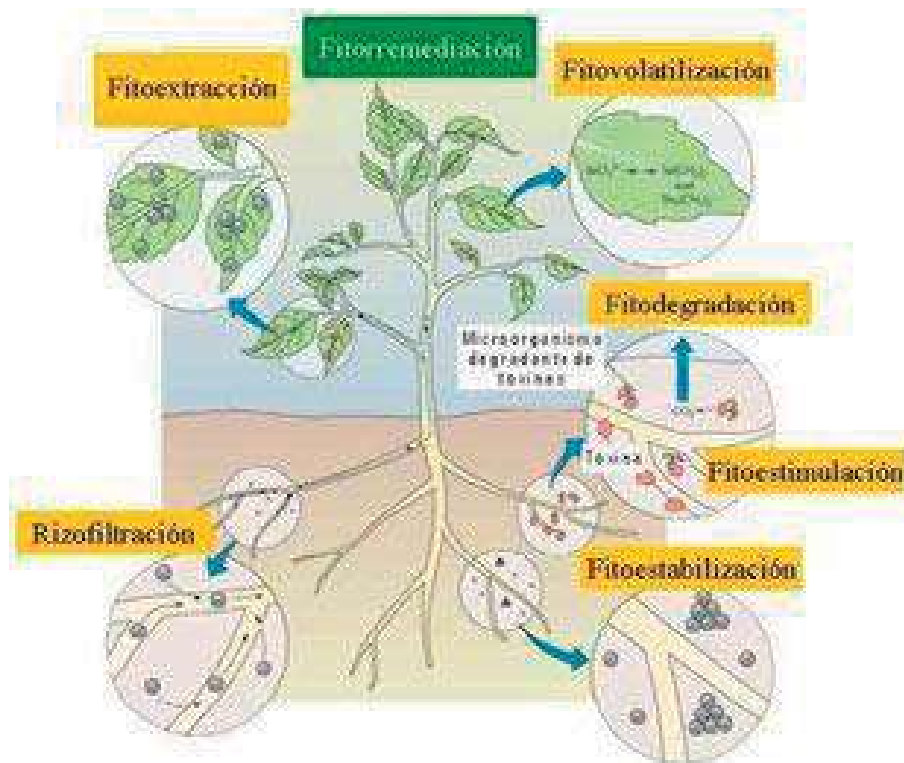


Figura 2. Esquematación de los Procesos de Fitorremediación

1.5 MECANISMO PARA LA CAPTURA Y TRANSPORTE DE METALES

La planta toma los metales en una serie de pasos que pueden ser descritos en general como:

1.5.1 Absorción de la raíz

Los metales solubles en la proximidad de la epidermis de la raíz penetran mediante los procesos de transporte pasivo (difusión) y activo. El ion del metal entra a la raíz por vía simplástica, cruzando la membrana plasmática de las células endodérmicas de la raíz o por la vía apoplástica a través del espacio entre las células (**Figura 3**). La manera más eficiente para que la raíz transporte el metal al brote es por el flujo vascular del xilema. Para incorporarse al xilema, el metal debe pasar a través de las células de la endodermis, ya que no puede cruzar la banda de Caspari, una capa impermeable hidrofóbica. Se piensa que el ion del metal usa los mismos procesos del transporte intercelular que los nutrientes esenciales. Las plantas que excluyen los metales pesados se cree que lo hacen aumentando la especificidad de las proteínas de transporte a los nutrientes esenciales o bombeando el metal tóxico fuera de la planta (Hall, 2002).

1.5.2 Transporte hacia las hojas

El metal es llevado a las hojas a través del xilema donde al descargarse e incorporarse a las células, debe atravesar otra vez varias membranas celulares (**Figura 3**). Diferentes hiperacumuladores almacenan el metal en diversos tipos de células de la hoja, por ej. *Thlaspi caerulescens* tiene más Zn en su epidermis que en su mesófilo, mientras que sucede lo contrario en *Arabidopsis halleri* (Kupper *et al*, 2000).

1.5.3 Desintoxicación por quelación

En cualquier etapa durante el transporte dentro del tejido la planta se puede desintoxicar por la conversión a un estado diferente de oxidación o por quelación del metal. Los diferentes estados de oxidación del metal, tienen diversas características de absorción, transporte, secuestro y toxicidad en la planta. Por ejemplo, las características de Cr(VI) dentro de la planta son diferentes de Cr(III) y es mucho más tóxico que Cr(III). Diferencias similares en características podrían existir entre las formas queladas y sin quelar del ion metálico. Puesto que los metales son en gran parte responsables del estrés oxidativo, es probable que las plantas hiperacumuladoras aumenten su producción antioxidante. Algunos de estos antioxidantes son conocidos como agentes quelantes de metales, tales como glutatión. De hecho, muchos quelantes de metales en plantas hiperacumuladoras contienen el ligando tiol de manera que la ruta biosintética que implica sulfuro (S) se considera muy importante para la hiperacumulación (van Huysen *et al*, 2004) y para posibles estrategias de fitorremediación.

1.5.4 Secuestro y/o volatilización del metal

El último paso en el transporte del metal a través de la planta es su secuestro dentro de los compartimientos convenientes para evitar que se interrumpan los procesos esenciales de la planta. Frecuentemente después de atravesar el citosol de las células de la hoja, el metal cruza la membrana vacuolar para ser secuestrado en la vacuola. Algunos iones metálicos, particularmente los polivalentes se adhieren en los sitios con carga negativa de la pared celular y allí permanecen secuestrados (Wang y Evangelou, 1994).

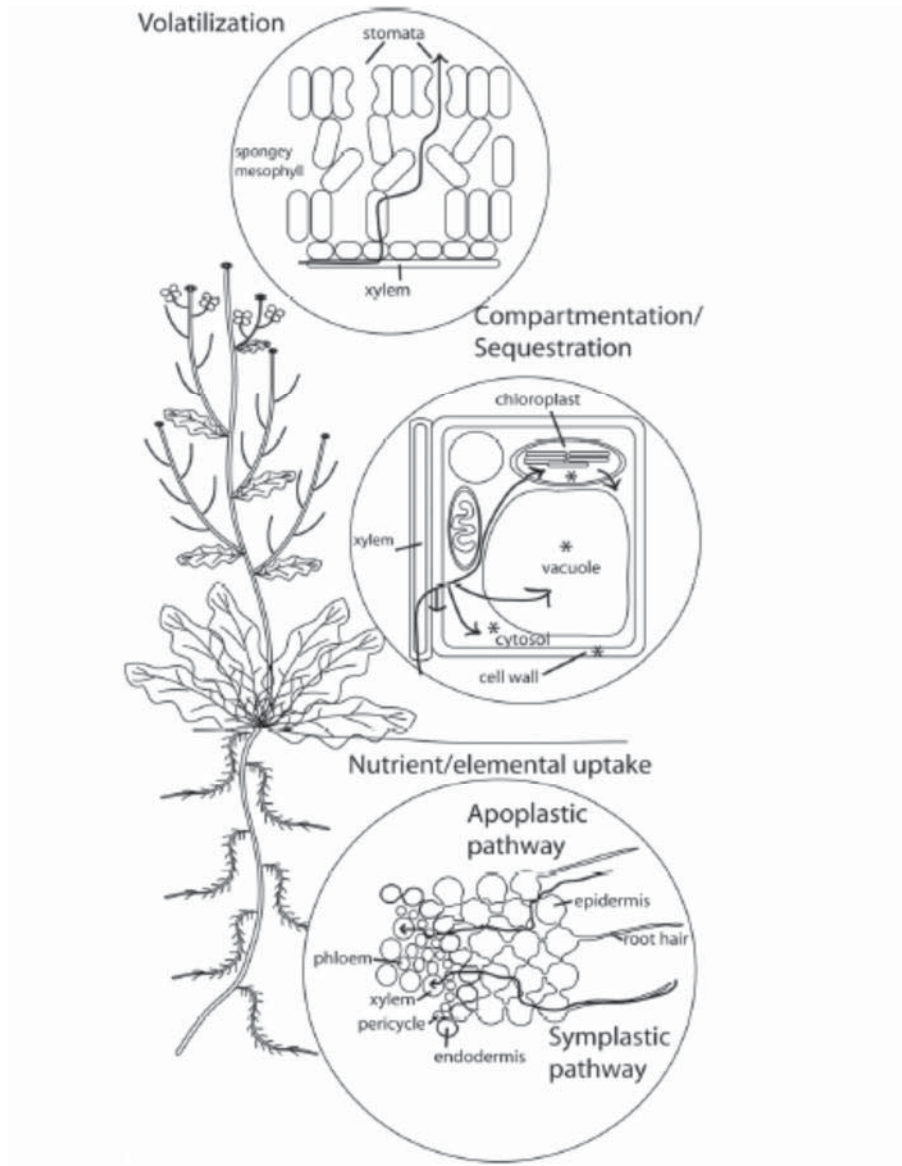


Figura 3. Representación esquemática del mecanismo de captura y transporte de metales pesados por las plantas (Peer et al, 2006).

1.6 SOLUBILIZACIÓN DE METALES DEL SUELO

Los metales considerados disponibles para las plantas son los que existen en forma soluble en el suelo y los que son fácilmente desorbidos o solubilizados por los exudados de las raíces o de otros componentes presentes en el suelo. Generalmente solo una pequeña porción del total de los metales contenidos en el suelo se encuentra disponible, siendo esta situación el principal problema de la fitorremediación, dado que su eficiencia depende de la abundancia relativa de las fuentes de metal soluble.

La solubilidad del metal es dependiente de las características del suelo y fuertemente influenciado por el pH (Harter, 1983) y el grado de complejación con ligandos solubles (Norvell, 1984). Los metales en el suelo existen en pequeñas partículas o asociados con diferentes componentes del suelo, incluyendo iones libres de metal y componentes del metal soluble en solución de suelo, iones intercambiables adsorbidos en fases inorgánicas de suelos, iones no intercambiables y precipitados o componentes insolubles inorgánicos metálicos, ejemplo óxidos, hidróxidos, fosfatos y carbonatos; complejos metálicos por materiales orgánicos solubles o insolubles y enlaces metálicos en minerales de sílice.

1.6.1 Solubilización del Plomo en el suelo

El plomo en suelo es generalmente considerado insoluble e indisponible para la planta debido a que se encuentra generalmente en forma de fosfatos de plomo, carbonatos de plomo e hidróxidos de plomo y la solubilidad de estos compuestos incrementa cuando el pH disminuye (McBride, 1994).

El plomo también puede ser solubilizado por la adición de quelantes o agentes acomplejantes, el quelante acompleja el ion de metal libre, permitiendo una disolución de las fases sorbidas o precipitadas hasta que ocurre un equilibrio entre el metal complejado, el metal libre y las fases insolubles (Norvell, 1991). La cantidad de plomo solubilizado y mantenido en la solución del suelo estará en función de la concentración quelada, la afinidad del quelante por el plomo y iones que compiten por él, y la solubilidad de los compuestos de plomo en el suelo. Los carbonatos y fosfatos de plomo tienen una solubilidad limitada y no están fácilmente disponibles como una fuente de plomo para la toma por la planta. Sin embargo, la adición de EDTA solubilizará el plomo de la fase carbonato y proveerá una fuente soluble de plomo para la raíz de la planta.

Las raíces de las plantas utilizan dos métodos para separar el metal y para convertirlo en una especie soluble: por la acidificación del suelo mediante las bombas de protones de la membrana plasmática o por la secreción de compuestos quelantes de metal. Estos métodos permiten a la planta adquirir minerales esenciales, pero en el caso del suelo que contiene metales tóxicos, tanto los minerales como el metal serán liberados. Las estrategias de fitorremediación para el Pb han incluido el uso de enmiendas del suelo tales como EDTA que solubiliza el Pb por quelación (Blaylock y Huang, 1997) (**Figura 4**). Sin embargo, las enmiendas del suelo tienen el inconveniente del riesgo de la filtración de las toxinas a niveles más profundos, contaminando el agua subterránea y los acuíferos.

En la extracción con EDTA de suelos contaminados con plomo antes y después de conducir extracciones secuenciales se observa la relación entre el metal extraíble por quelante y las fracciones químicas del suelo asociadas. En numerosos suelos contaminados por plomo estudiados, el EDTA removió consistentemente una gran porción de Pb de las fracciones consideradas biodisponibles (solubles intercambiables, carbonato, óxido y orgánicas) con muy poca extracción del plomo de la fracción residual (**Figura 4**).



Figura 4. Efecto de 5 quelantes sintéticos sobre la solubilidad de Pb en suelos contaminados con .5g/kg y su acumulación en plantas de chícharo (Huang *et al.*, 1997).

La habilidad para hacer metales disponibles para la toma por las planta en estas fracciones a través del uso de quelantes es vital para cualquier operación exitosa de fitoextracción. La próxima limitación será entonces la habilidad de la planta para acumular el metal de las formas solubles.

La cantidad de metales que pueden ser solubilizados por quelatantes sintéticos normalmente excede por mucho la extracción de las plantas, la **tabla 4** muestra datos de concentración de metal en lixiviados de suelo con y sin agregación de EDTA.

Metal	Conc. total en la columna de suelo	Metales en Filtros	
		Sin EDTA	Con EDTA
Pb	3280	1.58	116
Cu	860	3.19	136
Zn	1730	6.47	237
Cd	15.8	0.13	3.25

Tabla 4. Cantidad total de Pb, Cu, Zn y Cd en los filtros después de la aplicación de 1000 mL de agua de lluvia (adaptado por Chen *et al.*, 2004).

Los pastos son el género más adecuado para la fitorremediación de formas orgánicas e inorgánicas de metales, por su hábitat de crecimiento y adaptabilidad a una variedad de condiciones edáficas y climáticas (Singh *et al.*, 2003). En las *Asteraceae* se ha reportado por ejemplo tolerancia al plomo en *Sonchus oleraceus* y se le ha propuesto como especie fitoremediadora de ambientes contaminados con este metal (Xiong, 1997).

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es una especie que absorbe los metales pesados en gran cantidad por lo que se considera una planta hiperacumuladora favorable en la fitoextracción de Cd, Zn, Pb y elementos radiactivos, acumulándose más en sus raíces que en sus brotes, esto sugiere, que es necesario cosechar la biomasa entera de la planta (Christie *et al.*, 2004).

1.7 HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Las plantas han desarrollado numerosas estrategias para enfrentarse a los cambios medioambientales y una de las estrategias más exitosas ha sido la asociación de los sistemas radiculares con hongos MA (Sylvia y William 1992; Entry *et al.* 2002) cuya asociación es conocida como micorriza.

La simbiosis se define como la relación establecida entre dos o más organismos que viven juntos, con base a esto los dos tipos de simbiosis más aceptados son: **parasítica**, en la que un organismo toma de otro los compuestos necesarios para vivir, produciendo daños severos o la muerte del otro organismo y la simbiosis **mutualista**, en la que los organismos involucrados obtienen beneficios mutuos (Alarcón *et al.*, 2004).

El término micorriza proviene del latín “myco” (hongo) y “rhiza” (raíz) que significa hongo de raíz. Otro origen del término micorriza fue empleado por el botánico alemán Albert Frank en 1885, quien observó en raíces de árboles forestales ciertas estructuras peculiares las cuales denominó micorriza del griego “mykes” (hongo) y “rhiza” (raíz).

La simbiosis micorrízica arbuscular es una asociación entre un grupo particular de hongos y las raíces de las plantas teniendo como escenario el suelo, donde ambos organismos resultan beneficiados en aspectos fisiológicos y nutrimentales (**Figura 5**).

Un alto porcentaje de las plantas en los ecosistemas están asociadas con HMA. El término micorriza significa asociación hongo-raíz, lo cual es una asociación entre la raíz de una planta y el hongo específico que la micorriza.

Existen varios tipos de asociación siendo la más común la micorriza arbuscular. Los mayores beneficios de esta asociación son el incremento de la vida de la raíz, incrementando con ello el tiempo y el área de absorción de nutrientes. Las micorrizas son capaces de absorber, acumular y transferir los principales macro y micro nutrientes y el agua a la planta, más rápidamente que las raíces sin micorrizas.

Varias investigaciones muestran que las micorrizas incrementan la tolerancia de las plantas a la sequía, compactación, altas temperaturas del suelo, metales pesados, salinidad, toxinas orgánicas e inorgánicas y extremos de pH del suelo.

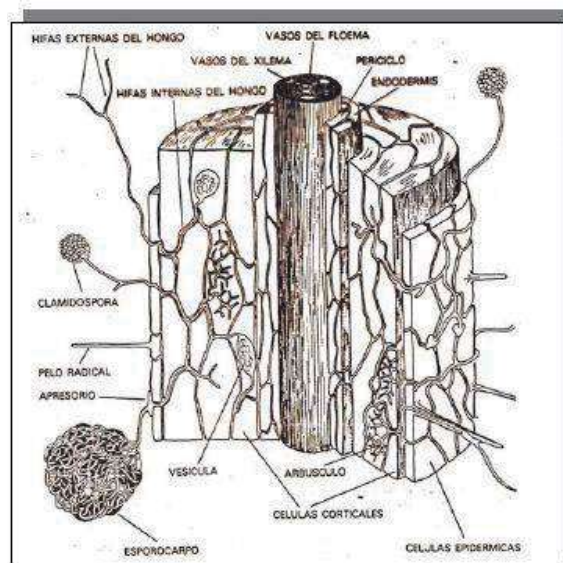


Figura 5. Simbiosis Micorrízico Arbuscular.

1.7.1 Clasificación de los hongos micorrízicos arbusculares

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares se consideraban hasta hace muy pocos años incluidos en la familia *Endogonaceae*, dentro del phylum Zygomycota, clasificación que estaba basada fundamentalmente en el análisis de las características morfológicas, estructurales y ontogénicas de las esporas que desarrollan (Gederman y Trappe 1974; Morton y Benny 1990; Redecker *et al.* 2000). De acuerdo con este criterio, las más de 150 especies descritas hasta la fecha, se incluyeron en el orden Glomales. Hasta entonces no se había puesto de manifiesto el posible origen monofilético de estos hongos compartiendo un ancestro común.

El origen monofilético hoy en día se ha podido determinar en base al análisis de la subunidad pequeña del ARNr 18S, agrupándose así en el nuevo phylum *Glomeromycota*. Dicho phylum, se encontraría más próximo de los ascomicetos y basidiomicetos, con los que compartiría un ancestro común con los *Zigomicetos* (Schüßler *et al.* 2001). El phylum *Glomeromycota* compuesto por una sola clase, los *Glomeromycetes*, que a su vez incluye cuatro órdenes: *Glomerales*, *Diversisporales*, *Paraglomerales* y *Archaesporales* (**Figura 6**).

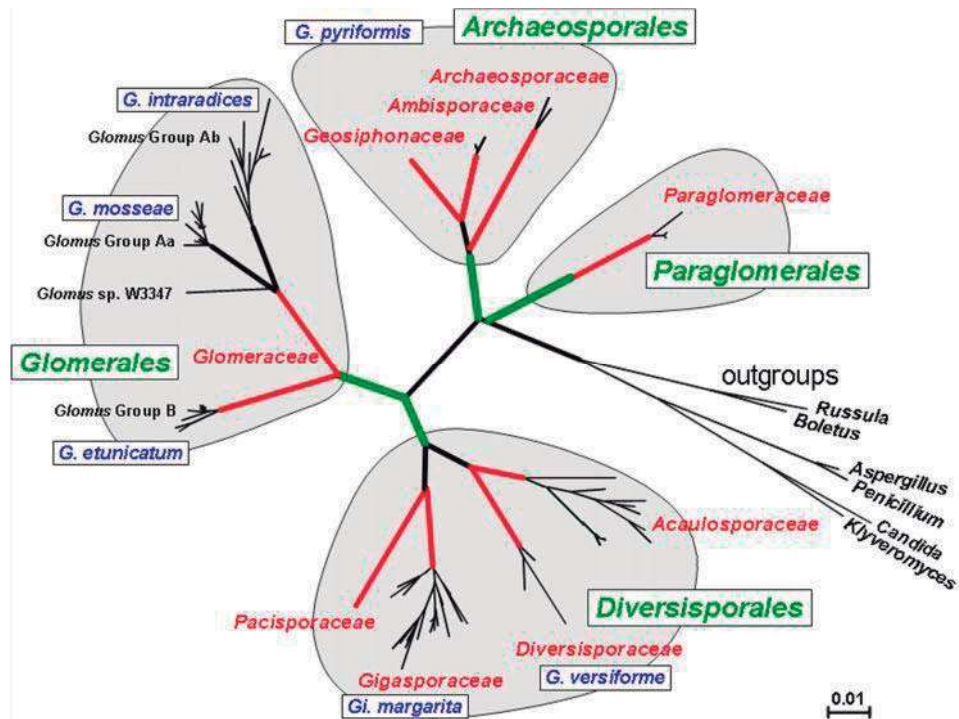


Figura 6. Estructura taxonómica propuesta del Phylum *Glomeromycota* en base a las secuencias de la SSU del ARNr 18S. Tomado de Schüßler *et al.* (2001).

1.8 HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES EN SUELOS CONTAMINADOS CON PLOMO

Los HMA son un componente natural de los suelos en la mayoría de los ecosistemas terrestres. Se sabe que más del 80% de las plantas terrestres son capaces de presentar una asociación simbiótica con éstos y pueden ser considerados como una extensión de las raíces de las plantas ya que amplían considerablemente el volumen de suelo que puede ser explorado y por ende incrementa la cantidad de nutrientes que pueden ser adquiridos por la planta (Harrison 1999).

El aporte de nutrimentos es más evidente cuando las plantas micorrizadas se encuentran en condiciones adversas para su crecimiento, como es el caso de suelos contaminados con plomo. Bajo esta condición, se ha reportado que en algunos casos las plantas micorrizadas pueden mostrar mayor captación de metales pesados por la raíz y aumentar el transporte de estos a la parte aérea de la planta (fitoextracción) (Rabie 2005), mientras que en otros casos el uso de HMA contribuye a la inmovilización del metal en las raíces de las plantas (Gaur y Andholeya, 2004) o en el suelo (González-Chávez *et al.*, 2004) (fitoestabilización) (**figura 7**).

Esto muestra que el resultado de la micorrización de plantas con fines de fitorremediación de suelos contaminados depende de la combinación planta-hongo-metal y está influenciado por las condiciones del suelo.

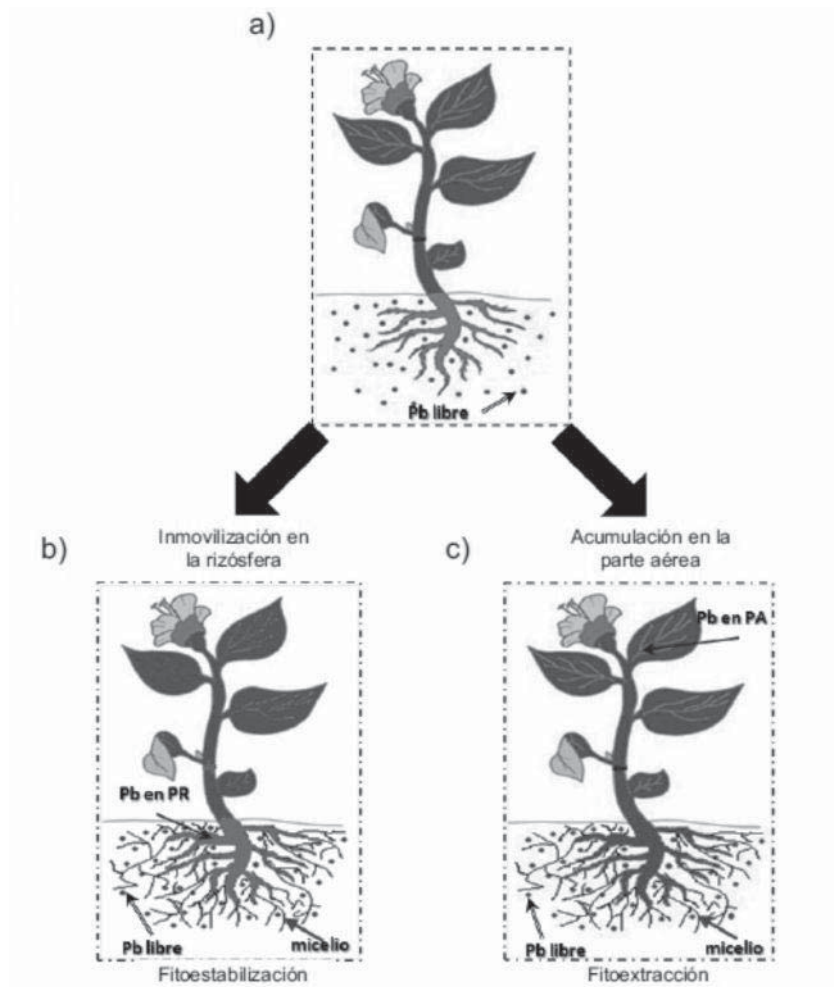


Figura 7. Representación esquemática de la utilización de un HMA para la fitorremediación de Pb. a) La Planta sin inocular, b) la planta inoculada con el HMA, presenta un aumento de Pb en sus raíces, c) la planta inoculada con HMA presenta un aumento de Pb en sus raíces y partes aéreas e inmoviliza metal en el suelo.

Las esporas de los HMA normalmente tienen diferente nivel de sensibilidad a la presencia de metales pesados en ausencia de las plantas dependiendo de la especie del hongo. En la fase presimbiótica, *Glomus intrarradices* es uno de los hongos micorrízicos que ha mostrado mayor tolerancia a metales como Cd y Pb (Pawlowska y Charvat, 2004). En fase simbiótica, este hongo también ha mostrado tolerancia a metales pesados; un ejemplo de ello es la mayor acumulación de Pb en las raíces micorrizadas de *Vetiveria zizanioides* con dicho hongo (Wong *et al.* 2007).

Los mecanismos de transporte de Pb en el micelio externo de los HMA han sido poco estudiados. Sin embargo, existen datos que sugieren que el transporte del Pb hacia el micelio interno podría ser a través del fósforo. El fósforo en HMA es transportado del micelio externo al interno principalmente en forma de polifosfato (Harrison y Van Buuren 1995, Maldonado-Mendoza *et al.* 2001). La unión del Pb y polifosfato ha sido observada como un mecanismo de estabilización de Pb en suelo (Gaur y Adholeya, 2004). El complejo Pb-polifosfato también ha sido observado en micelio interno de HMA (Turnau *et al.* 1993). Por lo tanto, existe la posibilidad de que el Pb sea transportado a la raíz micorrizada vía el micelio externo mediante el complejo Pb-polifosfato. Sin embargo, se requiere profundizar aún más en el estudio de los mecanismos del transporte de Pb a través del micelio de HMA.

1.8.1 Hongos micorrizicos arbusculares en la Fitoestabilización de plomo

La fitoestabilización consiste en inmovilizar metales pesados mediante el uso de especies de plantas tolerantes, con un sistema radicular que provea una buena cobertura de suelo. Las plantas con este tipo de sistemas radiculares pueden acumular una gran cantidad de Pb en las raíces. Además la presencia de HMA puede contribuir en una mayor inmovilización de éste. Entre las posibles estrategias de inmovilización de Pb por el hongo se encuentran: la inmovilización del Pb soluble mediante glicoproteínas secretadas por el hongo, la adsorción del Pb en las paredes celulares y la quelación de metales al interior de la hifa, siendo estas estrategias similares a las utilizadas por las plantas (Gaur y Andholeya 2004).

La glomalina es una glicoproteína insoluble secretada por el hongo que se ha encontrado en el suelo ligada a metales pesados. Para el caso específico de suelos contaminados con Pb se ha logrado extraer hasta 1.12 mg de Pb por gramo de glomalina (González-Chávez *et al.* 2004) y recientemente se ha observado que la concentración de Pb en la glomalina puede variar entre 0.8 y 15.5 % del total de Pb en el suelo (Vodnik *et al.* 2008).

Por otro lado, es ampliamente conocido que los HMA pueden producir una gran cantidad de micelio externo. También es conocido que la pared celular de este micelio está compuesta mayormente por quitina y que este compuesto estructural provee una eficiente superficie para la adsorción de los metales pesados del suelo (Galli *et al.* 1994, González-Chávez *et al.* 2004).

Este potencial de adsorción se debe a que las hifas del hongo presentan una mayor afinidad (2 a 4 veces más) que las raíces (Joner *et al.* 2000), por lo que la inoculación de plantas tolerantes con HMA podrían incrementar significativamente la estabilización de metales pesados contenidos en el suelo.

Otros agentes potenciales de retención del Pb en el micelio de los HMA son las metalotioneinas. En plantas acumuladoras de metales (Clemens 2001) y en hongos ectomicorrízicos (Morselt *et al.* 1986, Galli *et al.* 1994) se ha observado la presencia de estos polipéptidos capaces de adsorber metales pesados. Aunque estos compuestos no han sido aún observados en unión con Pb, se ha detectado en el micelio de HMA una alta expresión de un gen que codifica para la síntesis de este tipo de polipéptido en presencia de metales pesados (Lanfranco *et al.* 2002).

La absorción e inmovilización del Pb es mayor por las raíces que se encuentran micorrizadas en comparación a las de las raíces no micorrizadas (Gaur y Andholeya 2004, Chen *et al.* 2005). La forma en que el Pb se incorpora en el interior de la raíz micorrizada es desconocida. Sin embargo, se ha observado un aumento en el número de vesículas con el incremento de concentración de Pb en el suelo (Joner *et al.* 2000), lo que sugiere que el Pb en las raíces micorrizadas podría ser inmovilizado en las vesículas o en el interior del micelio interno.

La acumulación de metales pesados, tales como Cd, Zn y Cu, en el interior del micelio interno de HMA ha sido documentada especialmente en gránulos de polifosfato en el interior de la vacuola (Turnau *et al.* 1993). En el caso del Pb no se ha observado la acumulación en gránulos de polifosfato. Sin embargo, los HMA se caracterizan por adquirir una gran cantidad de fósforo y transportarlo de la solución del suelo al interior de la raíz en forma de polifosfato. Una vez que el

polifosfato llega a los arbúsculos, éste es liberado en la reacción de hidrólisis del polifosfato en las vacuolas de las células (Capaccio y Callow 1982, Saito 1995, Kojima *et al.* 1998, Ezawa *et al.* 2001). Lo anterior refleja el gran potencial los HMA con fines de fitoestabilización.

Sin embargo, se desconoce si la mayor estabilización de Pb en las raíces micorrizadas se realiza mediante: a) acumulación de Pb en vesículas, b) absorción en pared celular y/o en vacuolas en micelio interno, y c) absorción en pared celular y/o en polipéptidos en micelio externo. Probablemente la estabilización podría darse a través de un mecanismo como el propuesto para fósforo por Ezawa *et al.* (2001), donde el metal pesado puede quedarse en la vacuola o incorporarse en la pared celular del micelio.

También se debe tener en cuenta que el sistema es muy complejo y que el mecanismo no puede ser predicho de antemano, ya que cada sitio contaminado tiene sus características específicas, por lo que la elección de los genotipos de la planta y el hongo podrían determinar el comportamiento del sistema como fitoestabilizador o como fitoextractor. Ejemplo de todo lo anterior es la inoculación de *Vetiveria zizanioides* con *Glomus intrarradices* creciendo en suelo contaminado con concentraciones crecientes de Pb, donde se observó que a baja concentración de Pb (10 a 100 mg Pb kg⁻¹ suelo) sirvió como fitoestabilizador, mientras que a alta concentración de Pb (1,000 mg Pb kg⁻¹ suelo) se vio un aumento en la concentración de Pb en las partes aéreas (Wong 2007), funcionando como posible fitoextractor.

1.8.2 Hongos micorrizicos y fitoextraccion de plomo

La fitoextracción es la tecnología más atractiva para limpiar suelos contaminados con metales pesados (Kramer 2005). Mediante esta tecnología los metales son adquiridos por las raíces de las plantas y transportados a las partes aéreas (hojas y tallos), posteriormente hojas y tallos conteniendo los metales pesados pueden ser cosechadas, logrando así la remoción del contaminante e incluso su posterior recuperación (fitominería). Para esto se busca emplear plantas con características específicas, como son las hiperacumuladoras de metales pesados que son plantas con alta tolerancia a los metales pesados y una alta capacidad de acumulación de éstos. La desventaja encontrada en plantas con dichas características es que no tienen una buena generación de biomasa en un corto tiempo (Ernst 1998). Una de las principales limitaciones que encuentra la fitoextracción es la biodisponibilidad de los metales pesados para ser adquiridos por la planta. Una de las formas más comunes de mejorar esta deficiencia es la adición de quelantes sintéticos para aumentar la biodisponibilidad de los metales (Salt *et al.* 1995). Blaylock *et al.* (1997) demostraron la alta capacidad de del quelante sintético EDTA (ácido etilendiamino tetraacetico) para aumentar la fitoextraccion de Pb usando la planta *Brassica juncea*, esto debido a que el EDTA presenta una afinidad por el Pb y contribuye a ponerlo en forma biodisponible para la planta. Sin embargo, este método se considera que causa un daño secundario en el medio ambiente por la lixiviación del Pb hacia los mantos acuíferos (Chaney 2008), ya que los metales no pueden ser absorbidos por la planta a la misma velocidad en que son quelados.

Con la finalidad de volver estos procesos más amigables con el medio ambiente, se está buscado utilizar nuevas estrategias para mejorar la fitoextracción, como puede ser la utilización de HMA. Estos hongos podrían ayudar a incrementar la tolerancia de las plantas al Pb, el transporte de éste a la parte aérea debido a una mejor adquisición de nutrientes del suelo y contribuir en general al mejor desarrollo de la planta (Göhre y Paszkowski 2006).

La cantidad de Pb transportado a la parte aérea podría depender de factores como la combinación de planta y hongo, así como de la cantidad de Pb en el suelo. En este sentido se observó que la simbiosis *Glomus desertícola Eucalyptus globulus* incrementó significativamente la concentración de Pb en hojas y tallo en comparación a la simbiosis *G. mosseae-E. globulus*. Esta tolerancia a metales pesados por parte de las plantas micorrizadas podría estar relacionada con la acumulación en zonas metabólicamente menos activas como lo es el tallo (Arriagada *et al.* 2005). En relación a la especie de planta, se observó que en suelos con una concentración de Pb 1,500 mg Pb Kg⁻¹ suelo (Rabie 2005), las plantas de frijol inoculadas con *Glomus mosseae* acumulan mayor cantidad de Pb en la parte aérea en relación a su raíz, mientras que las plantas de trigo inoculadas a la misma concentración de Pb e inoculadas con el hongo, acumulan menor cantidad de Pb en la parte aérea en relación a la raíz (Rabie 2005). Esta mayor acumulación de Pb en la parte aérea de las plantas de frijol podría estar relacionada con a mayor nutrición de fósforo; mejorando con ello la síntesis de proteínas y de enzimas antioxidantes.

También se ha observado un mayor transporte de Pb hacia la parte aérea en suelos con valores inferiores a 1,500 mg Pb kg⁻¹ (Arriagada *et al.* 2005, Nowak 2007). Este comportamiento en el transporte de Pb coincide con la adquisición de nutrientes como nitrógeno y fósforo, lo cual sugiere que la fitoextracción podría depender en gran medida de una mayor toma de nutrientes por parte de la planta micorrizada.

1.9 ANTECEDENTES DE *Tagetes erecta*.

Existen algunos trabajos en los cuales se reporta el uso de *Tagetes erecta* con fines de fitorremediación de metales pesados. Como los realizados por Bosiacki en el 2008 en el cual llevaron a cabo experimentos con tres especies de plantas ornamentales: girasol común, salvia roja y cempasúchil. Estas plantas se sembraron en un sustrato artificial contaminado por cadmio. La dosis de cadmio aplicada en el experimento representa diferentes grados de contaminación. Los reportes de dicho experimento muestran que el incremento de la concentración de cadmio en el sustrato provocó una disminución del rendimiento en todas las especies estudiadas, con excepción de *T. erecta* donde se encontró un aumento del rendimiento de la planta. La determinación de la concentración de cadmio en el sustrato mostró que el menor contenido fue donde se cultivó *T. erecta*. El cadmio se acumula principalmente en las hojas y brotes y en inflorescencias. Mientras que la menor cantidad de este metal se encuentra en las raíces, con la excepción de *T. erecta*, donde la mayor cantidad de cadmio se encuentra en las raíces, después, en hojas y brotes, mientras que una cantidad muy pequeña estaba en inflorescencias. Por lo cual entre las especies vegetales estudiadas, las plantas de *T. erecta* fueron las que presentaron la absorción máxima de cadmio (**Figura 8**).

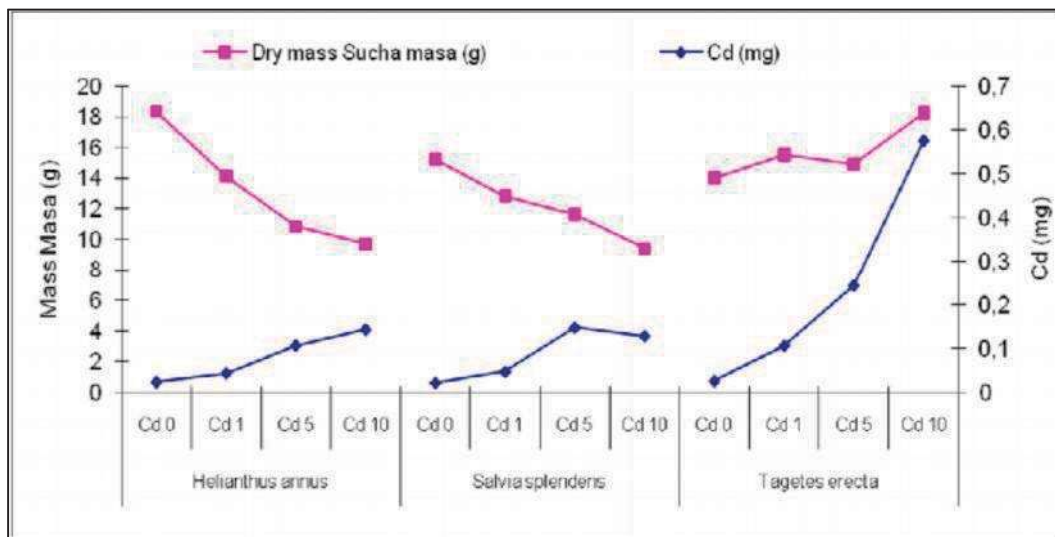


Figura 8. La absorción de cadmio por especies de plantas ornamentales (Bosiacki 2008).

Otro trabajo realizado también por Bosiacki (2009) donde realiza la investigación de la influencia del cadmio y plomo sobre el crecimiento de *T. erecta* L. de distintas especies y comprobar si estas plantas son aptas para ser plantados en suelos contaminados con estos metales. Las especies estudiadas de *T. erecta* se plantaron en un sustrato artificial contaminado con cadmio y plomo a diferentes concentraciones. Los análisis muestran que el mayor rendimiento fue alcanzado por la especie 'Titania', en el segundo lugar fue para 'Hawaii' y el menor rendimiento se obtuvo a partir de 'Mann im Mond'. Al analizar cuáles son los órganos de *T. erecta* L. que acumulan la mayor cantidad de cadmio y plomo, por el método de espectrofotometría atómica, se observó que la mayor absorción fue detectada en partes aéreas de las plantas de la variedad 'Hawaii', mientras que 'Titania' muestra la menor cantidad de los metales pesados. Por lo cual Bosiacki concluye que los tipos de *T. erecta* estudiados pueden ser utilizados para la remediación de suelos contaminados por metales pesados.

Otro reporte muy reciente es el de Sinhal *et al.* (2010) en el cual se estudian los efectos del EDTA y ácido cítrico en el potencial de acumulación de Zn, Cu, Pb y Cd por plantas de cempasúchil (*Tagetes erecta*). Los resultados muestran que la mayor concentración de EDTA y ácido cítrico (30 mg l⁻¹) causó una reducción importante en el crecimiento de las plantas en términos de altura, peso fresco, la clorofila total, contenido de carbohidratos y proteínas.

Se puede encontrar un reporte en el que se utilizó en sistema *Tagetes* micorrizadas con el hongo MA *Glomus intraradices*, presentado por El Seoud (2008), en el cual utilizando dos concentraciones de fósforo, reporta que *Tagetes* es muy dependiente de los hongos MA para adquirir fósforo y más cuando éste está a bajas concentraciones (40 mg P/kg de suelo), y que en la asociación *Tagetes-G. intraradices* existe una alta eficiencia de fósforo en comparación con plantas no micorrizadas.

JUSTIFICACIÓN

Por todo lo anterior queda muy clara la necesidad de encontrar sistemas con plantas tolerantes al plomo, así como buscar modelos más sustentables que ayuden a la solubilidad y la biodisponibilidad del plomo para las plantas. Por lo cual los hongos micorrizicos presentan una alternativa muy interesante en la búsqueda de aumentar la solubilización sin necesidad de adicionar quelantes sintéticos como el EDTA. El estudio de dicha simbiosis es pues un área muy prometedora para la fitorremediación de plomo.

Actualmente no existen reportes de estudio de la aplicación de la simbiosis *Tagetes erecta-Glomus intrarradices* con fines de fitorremediación, que debido a los antecedentes individuales parece ser prometedora.

HIPÓTESIS

Ya que las micorrizas aumentan el área superficial de la raíz de las plantas y el plomo se acumula mayormente en las paredes celulares de la raíz. La inoculación de la planta *Tagetes erecta* por el hongo micorrizico arbuscular *Glomus intrarradices* puede ayudar a mejorar la acumulación de plomo.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la simbiosis de la planta *Tagetes erecta* y el hongo micorrizico arbuscular *Glomus intrarradices*, en la eficiencia de acumulación de plomo proveniente de una fuente insoluble en forma de Pb_3O_4

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

2.1 EXPERIMENTO *IN VITRO*.

El objetivo de este experimento fue analizar el papel del hongo micorrizico arbuscular *Glomus intraradices* en la acumulación de plomo así como estudiar su morfología y la tolerancia a la presencia de plomo en el sistema. Se llevó a cabo *in vitro* para quitar las interferencias que presenta el uso de sustrato y el uso de planta hospedera.

2.1.1 Materiales y Métodos.

Se utilizó el medio mínimo descrito por Bécard y Fortin (1988) (descrito en el párrafo siguiente) para la creación y el mantenimiento de las raíces de zanahoria (*Daucus carota L.*) transformadas con *Agrobacterium rhizogenes*. Estas raíces se cultivaron solas o inoculadas con el hongo micorrizico arbuscular *Glomus intraradices*. El procedimiento en ambos casos es el mismo: se utilizan explantes, los cuales son subcultivados o se obtienen mediante la transferencia de un segmento de medio (bloques de aproximadamente 1 cm²) que contengan las raíces no micorrizadas o micorrizas y las esporas (según sea el caso) y se colocan en medio mínimo fresco.

La composición del medio mínimo de crecimiento en (mg•L⁻¹) es: 731 MgSO₄•7H₂O, 80 KNO₃, 65 KCl, 4.8 KH₂PO₄, 288 Ca(NO₃)₂•4H₂O, 8 NaFe EDTA, 0.75 KI, 6 MnCl₂•4H₂O, 2.65 ZnSO₄•7H₂O, 1.5 H₂BO₃, 0.13 CuSO₄•5H₂O, 0.0024 Na₂MoO₄•2H₂O, 3 glicina, 0.1 clorhidrato de tiamina, 0.1 clorhidrato de piridoxina, 0.5 ácido nicotínico, 50 de myo-inositol y 10000 sacarosa. El medio mínimo se solidifico con 4.0 mg L⁻¹ de Fitagel (Sigma-Aldrich ®) en lugar de agar bacteriologico. El pH del medio se ajustó a 5.5 con KOH 1M antes de la esterilización a 120 °C durante 15 min. Los explantes de las raíces no micorrizadas o micorrizas fueron cultivadas durante tres meses en cajas Petri (10 cm) a 25 °C y en la oscuridad.

El procedimiento de adición Pb^{2+} (ac) consistió en la agregación de 4 ml de estándar de Pb^{2+} (ac) (1000 mg/l de $Pb(NO_3)_2$, Mallinckrodt Baker Inc., Nueva Jersey, EE.UU.) a cada una de las cajas Petri que contiene el medio para obtener una concentración aproximada de 200 mg/l de Pb. Se llevó a cabo una esterilización por filtrado del estándar (VALUPREP®, sterile syringe filter .2 μ m, cellulose acetate), antes de ser agregado. Todo se realizó en campana de flujo laminar y bajo estricto cuidado para evitar perder cajas por contaminación.

El experimento consistió en 4 tratamientos: las raíces no micorrizadas sin plomo (de control) y con plomo; raíces micorrizadas sin plomo y con plomo. Los tratamientos se desarrollaron en réplicas de 4 para las cajas correspondientes a las raíces no micorrizadas con y sin plomo y de 10 para los conjuntos que consiste en raíces micorrizadas con y sin plomo. El número de repeticiones en las series correspondientes a las raíces micorrizadas se incrementó con el fin de obtener suficiente material del micelio y esporas del hongo para el posterior análisis cuantitativo elemental. Las cajas de Petri se incubaron a 25 °C en la oscuridad durante 4 semanas.

Durante el tiempo de crecimiento se analizaron las cajas periódicamente y se tomaron fotos mediante microscopio estereoscópico (Leica M80, Leica Application Suite V3), para llevar un registro sobre el crecimiento del micelio extra radical así como en el número de esporas. Para lo cual se definieron tres áreas de 1cm² por caja, de las cuales se fueron tomando las fotos cada semana, el criterio para definir estas áreas fue que presentaran micelio y esporas, para poder ver el cambio de estos con el tiempo. Esto se realizó una vez por semana y las fotos se analizaron al final del experimento.



Figura 9. Microscopio estereoscópico marca Leica M80, acoplado a cámara, con Leica Application Suite V3.

Después del período de las 4 semanas de crecimiento, se realizó la separación de raíces, esporas y micelio. Primero las raíces fueron extraídas cuidadosamente desde el medio de gel, limpiadas con varios enjuagues de agua destilada, secadas en el horno a 60 °C durante 48 hrs, las raíces una vez secas se muelen y se pesan.

Para la extracción de las esporas y el micelio (S/M) de las cajas sin plomo, se disuelve el gel con una solución 10 mM de citrato de sodio y se enjuagan en agua destilada y se filtran utilizando discos de vinilo de filtración de 10 μ m malla (Spectra / Mesh, Spectrum Medical Industries, Houston, TX, EE.UU.) previamente pesados. Para las cajas con Pb al hacer uso de la solución 10 mM de citrato de sodio se presentó una escasa solubilidad del medio con Pb. Por lo cual se llevó a cabo una separación agregando sacarosa(s) ~1g y después se centrifuga a 5000 rpm (modelo HN-SII, Damon / IEC División, Needham, MA, EE.UU.), se toma el sobre nadante y se agrega agua destilada y se repite el paso una vez más, al final de este se filtraron los S/M se secaron en las condiciones antes mencionados y se pesaron. Por último, el medio puro con y sin adición de Pb (sin cultivos desarrollados), también se secó y molió.

Para llevar a cabo la determinación de la colonización las raíces transformadas de zanahoria se tiñeron según el método de Vierheilig *et al.* (1998) (ver apéndice 1). Después se realizó el análisis de colonización en las raíces usando un método de segmentos de raíz (Biermann y Linderman, 1981) (ver apéndice 2). Treinta segmentos de raíz fueron seleccionados al azar por tratamiento. Se registraron los segmentos de raíz que contienen vesículas, arbusculos y el micelio intrarradical. La colonización de raíces se mide como la proporción del número total de segmentos de raíz con vesículas, arbusculos o micelio intrarradical.

El análisis elemental se realizó mediante espectrómetro de fluorescencia polarizada de rayos X de energía dispersiva (EPDXRF) (SpectroXepos-III, Spectro Analytical Instruments GmbH, Kleve, Alemania) mediante el análisis de Parámetros fundamentales con rayos X TurboQuant rutina® (TQ). La espectrometría de fluorescencia de Rayos X (XRF) es una técnica para el análisis elemental no-destrutivo. En este método, el fotón de rayos X que entra choca con los electrones de enlace en el átomo del elemento. La interacción más probable es con el electrón interior atado, llamado electrón de la capa K. El electrón golpeado es promovido hacia un orbital de mayor energía. La vacancia resultante en la capa más interna es llenada por la transición de un electrón de un orbital de mayor energía, lo cual consecuentemente resulta en la emisión de fotones de fluorescencia de rayos X característicos de esta transición. Los rayos X fluorescentes son colectados por un detector y analizados por equipo electrónico que discrimina entre las diferentes energías de rayos X, de esto se obtiene como resultado un espectro de rayos X de energía dispersada. Los rayos X fluorescentes son altamente específicos para cada elemento y se originan a través de las transiciones involucradas en la capa K, en particular, los rayos X $K\alpha$, obedecen a la Ley de Moseley por lo cual, las frecuencias, ν de los rayos X, varían de acuerdo a al cuadrado del número atómico Z del elemento. Sin embargo, este equipo tiene un requisito de peso mínimo relativamente importante, ya que el método necesita al menos 4 gr para el análisis.



Figura 10. Espectrómetro de fluorescencia polarizada de rayos X de energía dispersiva (EPDXRF) (SpectroXepos-III, Spectro Analytical Instruments GmbH, Kleve, Alemania).

Se utilizó un método de análisis que incorpora la rutina de polvos TQ, el cual, había sido previamente validado por más de 13 elementos del tercero a sexto períodos de la tabla periódica con un total de 8 Materiales Estándar de Referencia (SRM) en polvo obtenidos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, en Gaithersburg, MD, EE.UU.).

La precisión de los resultados experimentales se determinó como los errores estándar, mientras que los errores de los resultados obtenidos se calcularon utilizando las fórmulas habituales de propagación de errores estadísticos (Mandel, 1984).

2.2 EXPERIMENTO CON DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO

El Objetivo de este experimento fue estudiar el papel de la interacción *Tagetes erecta-Glomus intrarradices* acumulación de plomo, utilizando dos fuentes de nitrógeno

2.2.1 Materiales y Métodos.

Para iniciar este trabajo se analizaron diferentes mezclas de sustratos, siendo el primero a base de agrolita mayor a 2000 micras la cual no presentó una buena retención de agua, mientras que otro sustrato con agrolita muy pequeña, no permitía la permeabilidad del agua. También se preparó un sustrato a base agrolita-turba, siendo este sustrato el que, se decidió trabajar. Esta última mezcla consistió en dos partes de agrolita separadas por tamaño de partícula (mayores a 2000 micras y mayores 1000 pero menores de 2000 micras) y una de turba (PREMIER HORTICULTURE LTEE, Quebec, Canadá), todas en un porcentaje en peso. La finalidad de agregar la turba fue para que ayudara a la mezcla a tener mejor retención de agua y del plomo, ya que está constituida por materia orgánica la cual permite una mejor retención. Para lo cual fue necesario hacer el cálculo de la densidad aparente de cada uno de los elementos para poder preparar la mezcla de sustratos basados en el volumen de las macetas el cual fue de 330ml, este volumen se dividió en 3 partes iguales. **Tabla 5.**

Sustrato	Densidad (g/l)	Masa (g)
Agrolita 2000 micras	102.46	255.64
Agrolita 1000 micras	187.30	467.32
Turba	111.03	277.03

Tabla 5. Valores de densidad (g/l) para cada uno de los sustratos utilizados en la prueba de retención de humedad y los pesos (g) para preparar una cantidad de 1000 g de sustrato.

Una vez que se preparó el sustrato, para el inicio del experimento se utilizaron semillas de cempasúchil grande (*Tagetes erecta* L.) Service Plus, Le Houga, Francia).

Las semillas de *T. erecta* fueron esterilizadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 10% (v/v) durante 5 minutos en agitación constante, seguido de 3 lavados con abundante agua destilada. Las semillas se pusieron a germinar en un contenedor, el cual contenía la mezcla de sustrato a base de agrolita-turba (2:1) previamente esterilizado a 120 °C por 40 min.

Una vez que las semillas germinaron, se dejaron crecer durante 15 días. La mitad del lote fueron micorrizadas con un inoculo que contenía esporas de *Glomus intraradices*, agregándose aproximadamente 40 esporas por planta.

Posteriormente, todas las plántulas fueron trasplantadas en macetas cónicas de 5.0cm de diámetro interior superior, 4.0cm de diámetro interior inferior y 20.5cm de altura, las cuales fueron esterilizadas superficialmente con una solución de cloro al 10% V/V. Se colocó una planta por contenedor; a cada tubo se le colocó una malla de algodón en un extremo inferior, la cual se sujetó con cinta *Duct Tape*®, esto para poder recuperar los lixiviados más libres de partículas de sustrato. A cada contenedor se le agregó la mezcla de sustrato agrolita-turba previamente esterilizado hasta el volumen marcado de 330ml, lo que proporciona una masa de 50g, para después ser colocadas en forma suspendidas en camas de madera (**Figura 11**).



Figura 11. Camas de madera para suspender las macetas tipo columna (parte superior) y contenedor para germinación con mezcla de sustrato agrolita-turba (parte inferior).

El plomo se agregó a la mezcla de sustrato a en forma de tetra óxido de plomo (Pb_3O_4). El Pb_3O_4 es un compuesto altamente insoluble que es utilizado ampliamente en la industria debido a sus características anticorrosivas, se utiliza como base para las pinturas automotrices, entre otras. Por lo cual se decidió usarlo en esta forma además de que puede representar mejor las formas reales en las que se encuentra el plomo en suelos contaminados

La cantidad de tetra óxido se agregó de acuerdo al contenido de plomo en el compuesto, para lograr una concentración de 1000 ppm en el sustrato, esto mediante los siguientes cálculos:

$$\text{Masa Molar}_{Pb_3O_4} = 892.8g \cdot mol^{-1}$$

$$\text{Masa Molar}_{Pb} = 207.2g \cdot mol^{-1}$$

$$X = \text{Fracción Masa de Pb en } Pb_3O_4 = \frac{3(207.2g \cdot mol^{-1})}{892.8g \cdot mol^{-1}}$$

$$= 0.6962$$

$$1000 \times 10^{-6} \cdot 1/X = Y \text{ g de } Pb_3O_4$$

Dónde:

Y = gramos de Pb_3O_4 en 1g de sustrato necesarios para tener 1000 ppm de Pb en el sustrato.

Las plantas de los diferentes tratamientos fueron colocadas en cámara de crecimiento durante nueve semanas, las cuales estuvieron bajo condiciones controladas de $25 \pm 2^\circ C$, 75 % de humedad relativa y 14 horas de foto periodo. Se establecieron ocho tratamientos con 5 repeticiones en un diseño al azar. **Tabla 6.**

Tratamiento	Repeticiones
nM - Pb + NO_3^-	5
nM + Pb + NO_3^-	5
M - Pb + NO_3^-	5
M + Pb + NO_3^-	5
nM - Pb + NH_4^+	5
nM + Pb + NH_4^+	5
M - Pb + NH_4^+	5
M + Pb + NH_4^+	5

Tabla 6. Diseño del experimento. Plantas de *Tagetes erecta* no micorrizadas (nM); plantas micorrizadas con *G. intrarradices* (M); plantas sin plomo (-Pb); plantas con plomo (+Pb); plantas fertilizadas con nitrato (NO_3^-) y plantas fertilizadas con amonio (NH_4^+).

En todos los tratamientos se buscó trabajar a capacidad de campo, por lo cual se implementó un sistema de riego el cual nos permitiera esto, además de poder medir los volúmenes de agua agregados. El sistema consistió en lo siguiente: se puso un vaso de plástico graduado (para poder cuantificar el volumen de agua lixiviada) debajo de cada planta y se tomó un volumen constante de 20mL de lixiviado (**Figura 12**). Es decir, que cada día se agregó agua a cada maceta hasta llegar a la marca de 20mL de lixiviado y con esto asegurarnos de que cada maceta se encontraba a capacidad de campo.

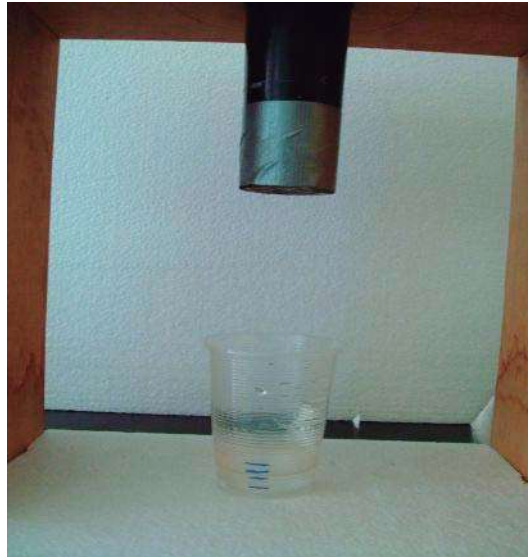


Figura 12. Concentrador para recuperar lixiviados en las macetas con sustrato y fertilización con nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+).

El procedimiento de este protocolo de riego fue el siguiente: El primer día se fue agregando agua poco a poco con una jeringa a cada maceta, dando intervalos de tiempo de 30 minutos entre agregación para asegurar que se humedecía totalmente el sustrato, esto hasta llegar a la primera gota de lixiviado, este volumen se tomó como el volumen de saturación, después se agregó agua hasta llegar a la marca de 20mL de lixiviado. Al día siguiente se mide el volumen de lixiviados, se registra y se afora a 20mL antes de regresarlo a la maceta, se espera un tiempo considerable (30min aprox.) y de ser necesario se agrega más agua hasta llegar a la marca de 20mL, esto se repite cada día durante el tiempo que dura el experimento. Al tener cuantificado el volumen agregado y el volumen de lixiviado en 20mL, nos permite calcular el volumen de agua presente en la maceta, así como el gasto diario de estas. Al final de cada semana se hacía una recolección de los lixiviados y se medía el pH, lo cual nos permitió monitorear los pequeños cambios que hubo conforme fue avanzando el crecimiento de las plantas durante el experimento. Cada semana se fue acumulando el volumen de lixiviados de cada maceta por lo cual el pH obtenido representa el acumulado en función del tiempo del experimento (nueve semanas).

Para asegurar un buen crecimiento de las plantas se les agregó por riego una solución nutritiva. Tres días después del trasplante se adicionaron los primeros 15 mL solución nutritiva en cada maceta (Bernal *et al.* 2007) con NO_3 ó NH_4 como fuentes de nitrógeno según el tratamiento, repitiéndose esto una vez por semana. La descripción del contenido de la solución nutritiva se detalla en la siguiente tabla (**Tabla 7**).

KH_2PO_4	0.01361g l^{-1}
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	0.2526g l^{-1}
CaSO_4	0.2582g l^{-1}
MgSO_4	0.3697g l^{-1}
EDTA	0.01655g l^{-1}
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.26428g l^{-1}
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.4723g l^{-1}
MnSO_4	0.064g l^{-1}
CuSO_4	0.0003g l^{-1}
ZnSO_4	0.0217g l^{-1}
H_3BO_3	0.0223g l^{-1}
$(\text{Na})_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0.0027g l^{-1}

Tabla 7. Concentración de elementos adicionados a las plantas de *Tagetes erecta* micorrizadas y no micorrizadas. Los tratamientos en donde se adiciono amonio, recibieron la fuente en forma de sulfato de amonio y el nitrato adicionado fue en forma nitrato de calcio.

Durante el periodo de crecimiento se recabaron datos biométricos para documentar cómo se desarrollaban las plantas en cada tratamiento, los parámetros medidos son los siguientes:

1. el número de tallos y numero de hojas así como
2. el ancho máximo,
3. altura máxima y
4. altura de ancho máximo.

Al pasar el periodo de desarrollo de nueve semanas de tratamiento las plantas fueron cosechadas. El primer paso consistió en separar el sustrato de la raíz realizándose una limpieza en forma manual para quitar el sustrato y después se realizaron 3 lavados con agua destilada para quitar los excesos de sustrato. La planta libre de sustrato, se pesó y luego se dividió en raíz, tallo y hojas los cuales también fueron pesados por separado. Se obtuvieron los pesos fresco y seco (g) del vástago y raíces. Para obtener los pesos secos, las partes de la planta se metieron en bolsas de papel de estraza y se metieron a secar en horno a 60°C durante cuatro días hasta tener un peso constante. Una vez pasado este periodo se pesaron para obtener los valores de peso seco y realizar el cálculo de porcentaje de agua en las plantas.

Para medir el área foliar (AF) después de la cosecha se utilizó un método desarrollado en el laboratorio (Castillo, *et al*, 2011), el cual consiste en tomar una muestra fresca en forma de disco (con un diámetro conocido) de varias hojas, pesarlos y sacar un promedio. Después se pesan todas las hojas y se hace un cálculo como el siguiente:

El peso del conjunto de hojas es W_{hojas} . Luego se escoge una hoja al azar y se corta un círculo de 10 mm de diámetro, se pesa el disco y se obtiene el valor de densidad superficial $\bar{\delta}$, que es también conocido como constante de Hughes.

$$\bar{\delta} = (\rho\phi)$$

Dónde:

ρ = Es la densidad del tejido de la hoja ($g \cdot cm^{-3}$)

ϕ = Es el grosor de la hoja (cm)

Además

$$\bar{\delta} = W_{disco} / \pi r^2 = 4W_{disco} / \pi$$

Dónde:

W_{disco} es el peso del disco

Por lo tanto tenemos que:

$$AF = W \text{ hojas} / \bar{\delta}$$

Se realizó la tinción de las raíces (ver apéndice 1) para el análisis de colonización en las raíces (ver apéndice 2). La colonización de raíces se mide como la proporción del número total de segmentos de raíz con vesículas, arbusculos y/o micelio intrarradicular.

Las partes de la planta que fueron utilizadas para la determinación del peso seco, también fueron utilizadas para la determinación de la concentración de Pb en hojas, tallos y raíz. El método implementado para la tal determinación fue mediante Espectrometría de Absorción Atómica por Flama (FAAS). Las muestras secas se molieron con un mortero y se realizaron las digestiones de acuerdo al protocolo US-EPA 3050 B (ver apéndice 5), incluyendo además las muestras: blanco, el método blanco *spike* y el *matrix spike*.

Dónde:

- **Blanco:** es solo agua destilada y se sigue el procedimiento del protocolo.
- **Método Blanco spike:** es agua destilada con 10µg/g de plomo y se sigue el protocolo.
- **Matrix Blanco Spike:** es agua destilada con 10µg/g de plomo, tejido de planta del control y se sigue con el protocolo.

Terminadas las digestiones se analizó la cantidad de plomo en un espectrofotómetro de absorción atómica de flama (FAAS), Perkin Elmer 3100. FAAS utiliza la absorción de la luz para determinar la cantidad de átomos en fase gas. Dado que las muestras son usualmente líquidas, los átomos o iones a analizar deben ser vaporizados en una flama. Los átomos absorben luz en el intervalo de longitud de onda de la luz ultravioleta o visible y esta radiación

provoca transiciones electrónicas a niveles de mayor energía. La concentración del analito es determinada por la cantidad de luz absorbida. Los análisis cuantitativos se llevan a cabo utilizando una curva de calibración realizada con anterioridad con estándares de concentración conocida.

Los datos obtenidos en cada una de las variables evaluadas se sometieron a un análisis de varianza y cuando se observaron diferencias se realizó una prueba de Tukey ($p < 0.05$) con el paquete estadístico *Assistat 7.5*.

2.3 EXPERIMENTO CON 2 DIFERENTES TAMAÑOS DE MACETA.

El Objetivo de este experimento fue analizar la interacción *Tagetes erecta-Glomus intraradices*, en la acumulación de plomo utilizando dos sistemas, de diferentes volúmenes, (pero con la misma mezcla de sustratos Agolita-turba, una fuente de plomo insoluble y una fuente de nitrógeno en forma de NO_3) buscando mejorar el crecimiento del hongo y la planta y que ayude de esta manera a la mayor acumulación de plomo. Así como cuantificar la cantidad de Pb absorbido y adsorbido en las raíces.

El aumento de volumen de las macetas aumenta significativamente el área superficial del suelo, lo cual puede beneficiar el crecimiento de la raíz así como el de los micelios extracelulares del hongo, lo cual ampliaría el área de toma de plomo que se encuentre disponible, es decir disuelto.

La fuente de nitrógeno se utilizó a base de NO_3 ya que fue los tratamientos fertilizados con esta fuente de nitrógeno presentaron las mayores concentraciones de plomo acumulado (ver resultados sección 3.2).

2.3.1 Materiales y Métodos.

Los materiales y métodos en este experimento fueron básicamente los mismos utilizados en el experimento anterior (ver sección 2.2.1), con la inclusión de algunas técnicas y parámetros medidos que se detallan más adelante.

Semillas de *T. erecta* fueron esterilizadas superficialmente remojándolas con una solución de hipoclorito de sodio al 0.1% (v/v). Se pusieron a germinar en un semillero el cual contenía la mezcla de sustrato a base de agrolita-turba (descrita anteriormente) previamente esterilizado a 120 °C por 40 min.

Una vez que las plántulas germinaron, la mitad del lote fueron inoculadas con esporas de *Glomus intraradices* (40 esporas por planta). Después de 15 días, las plántulas fueron trasplantadas en 2 tipos de macetas: las pequeñas de 5cm de diámetro interior superior, 4cm de diámetro interior inferior y 20.5cm de altura, y unas más grandes de 11cm de diámetro interior superior, 9cm de diámetro interior inferior y 14cm de altura, en todas las macetas se colocó una planta. A cada contenedor se le agregó la mezcla de sustrato agrolita-turba previamente esterilizado, para el caso de macetas pequeñas 50g de sustrato aproximadamente y para las macetas grandes 135g, ambas se colocaron suspendidas en camas de madera, el tratamiento para todas las macetas fue el mismo que en el experimento anterior (**Figura 11**).

Las plantas fueron colocadas en la cámara de crecimiento durante nueve semanas, las cuales estuvieron bajo condiciones controladas de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75 % de humedad relativa y 14 horas de foto periodo. Se establecieron ocho tratamientos con 5 repeticiones en un diseño al azar (**Tabla 8**).

Tratamiento	Repeticiones
nM - Pb + I	5
nM + Pb + I	5
M - Pb + I	5
M + Pb + I	5
nM - Pb + II	5
nM + Pb + II	5
M - Pb + II	5
M + Pb + II	5

Tabla 8. Diseño experimental, plantas no micorrizadas (nM); plantas micorrizadas (M); plantas sin Plomo (-Pb); plantas con Plomo (+Pb); plantas en macetas pequeñas (I) y plantas en macetas grandes (II).

El plomo se agregó a la mezcla de sustrato en forma de tetra óxido de plomo (Pb_3O_4). La cantidad de tetra óxido se agregó de acuerdo al contenido de plomo en el compuesto, para lograr una concentración de 1000 ppm en el sustrato (ver sección 2b).

El protocolo de riego fue el mismo que se utilizó en el experimento anterior (ver sección 2b). Para asegurar un buen crecimiento de las plantas se les agregó por riego solución nutritiva. Tres días después del trasplante se adicionó los primeros 15mL solución nutritiva Hoagland (citado en Bernal *et al.* 2007) con NO_3^- como fuente de nitrógeno.

Al pasar el periodo de desarrollo de nueve semanas de tratamiento las plantas fueron cosechadas (ver sección 2.2.1), se realizó un lavado con agua destilada para quitar los excesos de sustrato. Se pesó la planta completa y luego se dividió en raíz, tallo y hojas los cuales también fueron pesados por separado. Se obtuvieron los pesos fresco y seco (g) del vástago y raíces. Para obtener los pesos secos, las partes de la planta se metieron en bolsas de papel de estraza y se metieron a secar en horno a 60°C durante cuatro días hasta tener un peso constante. Una vez pasado este periodo se pesan para obtener los valores de peso seco y realizar el cálculo de porcentaje de agua en las plantas. Para medir el área foliar después de la cosecha se utilizó un método desarrollado en el laboratorio (Castillo, *et al*, 2011). (Descrito anteriormente, ver sección 2.2.1).

Se tomaron 3 plantas de cada tratamiento de las macetas pequeñas, a los cuales se le hizo un lavado especial en las raíces con una solución surfactante (detergente) al 1% V/V de HYCLIN-PLUS alcalino libre de fosfatos (HYCEL de México S.A de C.V.), el cual consistió en sumergir las raíces de la planta completa y agitar ligeramente de forma manual cada 15 minutos durante 3 horas, después se hacen lavados con agua destilada. Los residuos del lavado así como la solución surfactante se juntaron, filtraron y analizaron mediante espectrofotometría de absorción atómica de flama (FAAS) para medir la concentración de Pb en ellos.

Se llevaron a cabo mediciones del volumen de la raíz ($\text{cm}^3/\text{raíz}$) por el método de desplazamiento de volumen, longitud (cm) y se realizaron cálculos de densidad.

Se realizó la determinación de la colonización, para lo cual se tiñeron según el método de Vierheilig *et al.* (1998) (ver apéndice 1). Después se realizó el análisis de colonización en las raíces usando un método de segmentos de raíz (Biermann y Linderman, 1981) (ver apéndice 2). Los segmentos de raíces se cortaron en trozos de 1 cm de longitud para facilitar la exploración y se observan bajo un microscopio (Leica DM750). Los segmentos de raíz fueron seleccionados al azar por tratamiento. Se registraron los segmentos de raíz que contienen vesículas, arbusculos y el micelio intrarradical. La colonización de raíces se mide como la proporción del número total de segmentos de raíz con vesículas, arbusculos o micelio intrarradical.

Las muestras de tejidos de plantas se separaron en parte aérea y parte raíz y se se metieron en bolsas de papel de estraza para poner a secar en horno a 60°C durante cuatro días hasta tener un peso constante. Después fueron molidas con un molido para tejidos (THOMAS SCIENTIFIC, modelo 3383L10, EU). El análisis de la concentración de plomo se realizó por FAAS.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Intra and extra radical responses of the *Daucus carota* L.-*Glomus intraradices* system to lead in *in vitro* cultures and its significance for the mycorrhizo-remediation of lead

C. J. Alvarado^a, J. E. Ambriz^a, J.C. Arteaga-Velazquez^b, N. Dasgupta-Schubert^a,
H. J. Villegas^{a,*}

^a*Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas;* ^b*Instituto de Física y
Matemáticas;*

*Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, C.P. 58060,
Michoacán, México*

* Corresponding author.

E-mail address: vmoreno@umich.mx (H. J. Villegas)

Telephone: +52 443 326 5788

Fax: +52 443 326 5790

Abstract

This work constitutes a study of how lead (Pb) stress affects fungal structures and the concentrations of P, Fe and Pb within the root, the spores and the associated mycelia (S/M) in an *in vitro* system. Cultures of Ri T-DNA transformed carrot (*Daucus carota* L.) roots were inoculated with *Glomus intraradices*, treated with $Pb(NO_3)_2$ solution and subsequently analyzed by polarized x-ray fluorescence energy dispersive spectrometry (pEDXRF). Upon Pb treatment, the percentages of mycorrhizal colonization, vesicles, arbuscles and mycelia increased as well as the areas of the vesicles and the spores, although the number of spores decreased. The S/M and the mycorrhizal root showed enhanced concentrations of Pb, Fe and P. These were particularly marked for Fe in the Pb treated cultures. This indicates a synergistic relationship between the AM fungus and the host and the induction of higher Pb tolerance by the fungus to the host, possibly through higher Fe absorption. Possible Pb uptake mechanisms that connect with the observed morphological features are discussed. The experimental bio-concentration factors permitted an estimation of the Pb phytostabilization efficiency of the mycorrhizal and non-mycorrhizal roots. The protective effect of AM fungi against root Pb toxicity appears to be based on the number and size of fungal structures with reduced metabolic activity, such as the vesicles.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi; *Glomus intraradices*; Lead

1. Introduction

Pollution by lead (Pb) of the environment is a global concern, making it one of the prime hazardous substances being monitored by United Nations Environmental Program (UNEP) (United Nations Environment Programme, 2011). Pb is a physiologically non-essential element to living organisms. Therefore its presence within the organism contributes only deleteriously, towards toxicity. Soil contamination with Pb arises from the excessive use of agrochemicals (Wong *et al.*, 2002), from industrial waste (Fu *et al.*, 2008) as well as from mining activity (Schulin *et al.*, 2007). The productivity of crop plants in agricultural soil due to such contamination is seriously affected as a consequence of the phytotoxicity of Pb. This causes the inhibition of photosynthesis, the disturbance of mineral nutrition and water balance, the changes to hormonal status and impacts membrane structure and permeability (Sharma and Dubey, 2005). Phytoremediation is an emergent environmental biotechnology that utilizes the metal uptake capacity of certain metal tolerant plants to clean up contaminated sites (Peer *et al.*, 2005). It is being increasingly sought as a low-cost and sustainable alternative to conventional methods of environmental remediation (Pilon-Smits, 2005). However, the effectiveness of phytoremediation depends on the augmentation of plant biomass and the heavy metal accumulation capacity of the plant. It is in this sense that symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi (AM fungi) is being increasingly viewed as a means to enhance the phytoremediation capability of the plant (Alvarado *et al.*, 2011), giving rise to the term “mycorrhizo-remediation” (Giasson *et al.*, 2006).

AM fungi are soil micro-organisms that establish mutual symbiosis with the majority of higher plants, providing a direct physical link between soil and plant roots. AM fungi form a highly elaborated mycelium network (hyphae) in soil which effectively increases the plant's contact area with the soil thereby enhancing root absorption (Smith and Read, 2008). By colonizing the roots, the fungus increases plant growth by improving the accessibility of essential mineral nutrients such as P and Fe (Garg and Chandel, 2010) and by increasing water absorption, aside from its other benefits to soil structure and to the suppression of soil erosion (Smith and Read, 2008). Mycorrhization by AM fungi tolerant to heavy metals (HM) enhances plant resistance towards HM toxicity (Gaur and Adholeya, 2004). Amongst several types of AM fungi, Giasson *et al* (2006) found that plants colonized by *Glomus intraradices* showed the highest tolerance and capacity for HM extraction. Intraradical structures of *G. intraradices* have been observed to enhance the root's storage capacity of the HM copper, indicating the potential of this AM fungus for the technology of soil HM phytostabilization (Castillo *et al.*, 2011).

In the context of root colonization by AM fungi in Pb polluted sites, the degree of colonization appears to depend on the particular fungal specie, on fungal sensitivity or tolerance to Pb and on the level of Pb contamination. While a diversity of observations exists, in general sensitive fungi appear to show a decrease in intraradical colonization and a diminution of mycorrhizal structures (Andrade *et al.*, 2004; Vogel-Mikuš *et al.*, 2005; Sudová *et al.*, 2007) while Pb tolerant AM fungi generally show an increase (Malcova *et al.*, 2003; Vogel-Mikuš *et al.*, 2006). Several studies have shown that intraradical colonization by AM fungi in plants grown on Pb contaminated soil has led to the increase of the concentrations of Pb

sequestered within the plant root (Wong *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010). However, as far as the development of the AM fungus in the soil is concerned, Meharg and Cairney (2000) assert that for both sensitive and tolerant fungi there occurs a decrease of the development in soils heavily polluted with HMs such as Pb. Studies have shown that elevated soil Pb content decreases the mycorrhizal soil population (Del Val *et al.*, 1999) and that high concentrations of Pb in the medium reduce the spore germination, the pre-symbiotic hyphal length (Arriagada *et al.*, 2005) and sporulation (Nowak, 2007) with the spores recovering their functionality when transferred out to a medium devoid of Pb (Arriagada *et al.*, 2005).

It is clear from the foregoing that to get a composite idea about the manner in which the HM is taken up from soil/substrate and stored in the root of the plant colonized by the AM fungus, it is necessary to simultaneously study the response of the extra-radical and intra-radical components of the AM fungus-plant system. Such studies are relatively few in number in part because the extraction of extra-radical mycelium from soil is relatively difficult (González-Guerrero *et al.*, 2008). Monoxenic *in vitro* cultures of the AM fungus-root system provide a useful medium to undertake such studies and its technical advantages are being increasingly exploited to probe targeted aspects of the plant-AM fungus symbiosis (Declerck *et al.*, 2005). Compartmentalized *in vitro* cultures make it possible to observe the external mycelium of the fungus without the interference of the root. Using such a system, Pawlowska and Chavat (2004) showed that in the compartment contaminated with Pb a reduction of the hyphal length occurred, whereas in the compartment where Pb was not applied, the hyphal length was not affected. In a landmark experiment, González-Guerrero *et al.* (2008) used *in vitro* cultures of *G.*

Intraradices – Ri-T DNA transformed *Daucus carota* L. roots to determine the localization of three HMs, Zn, Cu and Cd, in the extraradical mycelium and spores and thereby pin-pointed the cytological structures involved in HM accumulation within the AM fungus.

The objective of the present work is to study the morphological changes of the extra-radical and intra-radical structures of *G. Intraradices* such as the spores, mycelium and vesicles when the AM fungus-plant root system is exposed to a high Pb concentration and concomitantly, the concentrations of Pb and the nutrients P and Fe within the extra-radical structures and the colonized root. While the enhancement of the uptake of P and Fe mediated by the AM fungus is adequately documented (Garg and Chandel, 2010), the interest in the present work lies in the question of how the ingress of the toxic element Pb into symbiotic system interacts with its ability to take up P and Fe - an aspect that has been hitherto insufficiently studied. The approach for the realization of these objectives is by the *in vitro* culture of *G. Intraradices* with Ri-T DNA transformed roots of carrot, *Daucus carota* L., stereo-microscopic image analysis and trace-level elemental concentration analysis using the relatively new technique of polarized x-ray energy dispersive x-ray fluorescence spectrometry (pEDXRF).

2. Materials and methods

2.1.1 Roots and the mycorrhizal inoculum

The minimal medium of Bécard and Fortin (1988) is used as the standard growth medium for the establishment and maintenance of the Ri-T DNA transformed carrot (*Daucus carota* L.) roots with transformation by *Agrobacterium*

rhizogenes. These roots are cultured either alone or with the AM fungus *G. intraradices*. In both cases, explants are routinely sub-cultured or propagated by transferring the media (blocks of approximately 1 cm²) containing either non-mycorrhizal or mycorrhizal roots and spores onto fresh minimal medium. The minimal growth medium contains (mg·L⁻¹): 731 MgSO₄·7H₂O, 80 KNO₃, 65 KCl, 4.8 KH₂PO₄, 288 Ca(NO₃)₂·4H₂O, 8 NaFeEDTA, 0.75 KI, 6 MnCl₂·4H₂O, 2.65 ZnSO₄·7H₂O, 1.5 H₂BO₃, 0.13 CuSO₄·5H₂O, 0.0024 Na₂MoO₄·2H₂O, 3 glycine, 0.1 thiamine hydrochloride, 0.1 pyridoxine hydrochloride, 0.5 nicotinic acid, 50 myo-inositol, and 10,000 sucrose. For the present experiment, the minimal medium was solidified with 4,000 mgL⁻¹ of Phytigel (Sigma[®]) instead of Bacto-agar. The pH of the media was adjusted to 5.5 before sterilization at 120 °C for 15 min. The explants of non-mycorrhizal or mycorrhizal roots were grown for three months in inverted petri-dishes at 25 °C in the dark.

2.1.2 Treatment with Pb

The Pb spiking procedure consisted of the addition of 4 ml of the Pb standard (1000 mg/l Pb(NO₃)₂, Mallinckrodt Baker) to the Petri dish containing the medium and the biological material (mycorrhizal or non-mycorrhizal root explants), to yield a Pb concentration of ~ 200 mg/l. The Pb solution was added drop by drop in a uniform manner over the solidified gel so that diffusion ensured a uniform Pb concentration over the volume of the medium in a relatively short time period. This treatment was done after the biological material had been allowed to stabilize and grow for a period of about eight weeks. The treatments of this experiment were: non-mycorrhizal roots without Pb (control) and with Pb; mycorrhizal roots without

Pb and with Pb. Cultures were grown in replicates of four for the sets corresponding to non-mycorrhizal roots with and without Pb and of ten for the sets consisting of mycorrhizal roots with and without Pb. The number of replicates in the sets corresponding to the mycorrhizal roots was increased so as to obtain enough material of the mycelium and spores of the fungus for the subsequent quantitative elemental analysis (section 2.4). The inverted petri-dishes were incubated at 25°C in the dark for four weeks.

2.2 *Microscopy and intra/extra root colonization*

After the 4 week growth period post treatment with Pb, the transformed carrot roots were carefully extracted from the gel, cleaned by rinsing several times with DI water, blotted dry and screened microscopically for any adhering mycorrhizal parts. Sub-samples of the cleaned roots corresponding to each treatment type were arbitrarily selected for the quantification of root colonization and the rest of the roots were set aside for elemental analysis (section 2.3). These root sub-samples were stained according to the method of Vierheilig *et al.* (1998). Root colonization was determined using the root segments method (Biermann and Linderman, 1981). Stained roots segments corresponding to each treatment were suspended in a petri-dish containing DI water and root segments were randomly selected from the suspension. The root segments were cut in pieces 1 cm in length to facilitate scanning and were viewed under an optical microscope LEICA DM750 under the magnification of 40X. Ten root segments were randomly selected per treatment. The number of root segments containing vesicles, arbuscules and intraradical mycelium were recorded. Root colonization was quantitatively measured as the proportion of the total number of root segments with vesicles, arbuscules or

intraradical mycelium. Mycorrhizal structures such as vesicles, mycelium and arbuscules were visually identified and quantitatively evaluated as the proportion of the total number of root segments per treatment.

Photographs of the root segments containing the intraradical mycorrhizal structures taken with the optical microscope were thereafter analyzed with the software Leica Application Suite V3. The petri-dishes with the gel medium containing the extra-radical spores and mycelium were viewed in the stereo microscope Leica M80 under the magnification of 10X and analyzed for their dimensions using the aforesaid software.

2.3 *Elemental analysis*

The cleaned root samples that remained after the sub-set for the microscopic analysis had been selected, were dried in the oven at 60°C for 48 h. Dried roots were pulverized and weighed. For the extraction of the extra-radical spores and mycelium (S/M) the gel medium in each petri-dish was dissolved in DI water and 5 ml of a solution of 10 mM sodium citrate were also added. The dissolved medium with the S/M was centrifuged at 5000 rpm (Damon IEC HN-SII) and filtered using previously weighed vinyl filtration discs of mesh size 10µm (Spectra/Mesh®). After several rinses with DI water, the filters with the S/M were dried under the aforesaid conditions and weighed. The medium of the Control was filtered in a likewise manner and the filtration disc thereafter dried and weighed to serve as 'matrix blank' for the subsequent analysis. Finally, the pure gel media with and without Pb spiking (with no cultures grown), were dried and powdered to provide the substrate concentrations.

The elemental analysis was done using a pEDXRF spectrometer (SpectroXepos-III, Spectro Analytical Instruments GmbH, Kleve, Germany) using the x-ray Fundamental Parameters analysis routine TurboQuant® (TQ) for powders. However, the relatively large minimum weight requirement of the method necessitated the suitable pooling of the experimental replicates resulting in a maximum of duplicates for the analysis. The samples were spun during the analysis to enable the homogenization of the particle distributions. The analytical method incorporating the TQ powder routine had previously been validated for more than 13 elements of the 3rd to 6th periods of the periodic table using a total of eight Standard Reference Material® (SRM) powders obtained from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). Also, for plant materials of low sample masses, the analytical methodology had been previously validated in an independent experiment by cross-laboratory analysis using independent analytical techniques (Alvarado *et al.*, 2011). Precisions on primary experimental results were computed as standard errors while the errors of derived results were calculated using the standard formulae of statistical error propagation (Mandel, 1984).

Note: pEDXRF is a development in EDXRF instrumentation (Schramm and Heckel, 1998) since the mid-nineties and commercial spectrometers have been sold since the early years of this century. The features consist of the polarization of the exciting x-ray beam by a combination of Bragg crystal reflectors and Barkla scatterers and 3D optics whose notable aspect is the orthogonality of the optical path between the exciting x-ray and the beam of fluoresced x-rays collected at the detector. These features, amongst others, allow a reduction of the background

radiation, particularly from Bremsstrahlung, so that higher sensitivities and resolution of the EDXRF spectra can now be achieved.

3. Results and discussion

3.1 *Mycorrhizal root colonization*

Fig. 1 shows the stereo-microscopic images of sections of the transformed *D. carota* root inoculated with *G. intraradices* (figures 1A and 1B) as well as the extraradical S/M in the growth medium (figures 1C and 1D), with and without the Pb treatments, respectively. The results of the quantitative image analyses are presented in Tables 1 and 2.

The percentages of root colonization, vesicles, mycelia and arbuscules are presented in Table 1. Root colonization increased from 48 % in the treatment without Pb to 62 % in the treatment with Pb. The percentage of structures such as vesicles and mycelia also increased in the mycorrhizal roots subjected to the treatment with Pb. Only the percentage of arbuscules showed a reduction in the treatment with Pb. The values are shown in Table 1.

In the treatments without Pb and with Pb, the number of spores averaged 91 and 79 per cm^2 respectively in the minimal medium used for the growth. Pb application affected the total spore number produced by *G. intraradices* in the growth medium, decreasing the spore number by 14 %. The area of the AM fungal (AMF) spores was also influenced by application of Pb. (N.B. The area refers to the projected area on the plane of the image, not the 3D surface area). In contrast to spore number, the area of the spores increased in the treatment with Pb from $4480 \mu\text{m}^2 \text{ spore}^{-1}$ in the treatment without Pb to $7000 \mu\text{m}^2 \text{ spore}^{-1}$ in the treatment with Pb. Table 2 shows the results.

Both the percentage of vesicles and the area of vesicles increased in the treatment with Pb (Tables 1 and 2). The mean value for the area in the treatment without Pb was $0.138 \text{ mm}^2 \text{ vesicle}^{-1}$, whereas the mean value for treatment with Pb was $0.161 \text{ mm}^2 \text{ vesicle}^{-1}$. The aforesaid results show that mycorrhizal colonization increased in the transformed *D. carota* L. roots exposed to solubilized Pb at non-fatally toxic concentrations. The increase of mycorrhizal colonization has been observed in heavy metal contaminated soils (Wong *et al.*, 2007) and interpreted as the fungus's response to the tolerance of the heavy metals (Arriagada *et al.*, 2005). The increase of vesicle area, vesicle number and intraradical mycelia in mycorrhizal roots as compared with non-mycorrhizal roots suggests that this increase might be interpreted as both a mechanism of protection of the host and as a mechanism of survival of the fungus inside the root. In contrast, it has been observed that with high doses of Pb, mycorrhizal colonization decreases (Koul *et al.*, 2001; Andrade *et al.*, 2004; Vogel-Mikus *et al.*, 2005). Therefore, the concentration of Pb considered in this experiment appears to be within the tolerance range of the *G. intraradices*-*D. carota* L. system studied in this work.

It has been observed that spore germination of AM is inhibited in a medium with high Pb concentration but when they are transferred to a medium without Pb, these spores recover their functionality (Pawlowska and Chavat, 2004; Arriagada *et al.*, 2005). The mechanism of protection of AM spores against heavy metals has not been sufficiently elucidated. However, the increase of AM spore area observed in this experiment seems to be responsible for the retention of functionality of AM spores. Heavy metals tolerant AM fungi have high affinity for heavy metals (Joner *et al.*, 2000) and their tolerance to heavy metals might be also related to spore

morphological changes, such as observed in this work for *G. intraradices* in the presence of Pb. This aspect is probed further in section 3.2.

The AM spore number is reduced with the addition of Pb. These results agree with previous studies (Del Val *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2004; Pawlowska and Chavat, 2004). Decrease of spore number was not accompanied by a disappearance of AMF propagules, suggesting a certain adaptation to the medium with Pb (Del Val *et al.*, 1999). Moreover, a lower spore number in mycorrhizal roots exposed to Pb in relation to mycorrhizal roots without Pb may be related to a re-allocation of carbohydrates obtained by AM fungi from transformed roots. The re-allocation of carbohydrates by the mycorrhizal fungus is supported by previous authors, who have found a decrease of extra-radical mycelia when heavy metals are added (Pawlowska and Chavat, 2004).

3.2 *Qualitative analysis of mycorrhizal structures vis à vis Pb concentrations in the medium*

Some visual aspects of the AM fungal morphology shown in Fig.1 combined with the associated quantitative morphological analysis presented in Tables 1 and 2, are striking given the correlation with the elevated concentrations of mobile aqueous phase Pb ions ($Pb^{2+}(aq)$) present in the medium. In the presence of $Pb^{2+}(aq)$, the spores and vesicles respond by increasing their size, by changing color to yellowish-red (spores) or their shape (vesicles). Cellular absorption of HM ions affects water relations that cause changes in cell wall mechanical properties such as cell wall extensibility (Poschenrieder and Barceló, 2004). In accordance with the well-known law of electrostatics in physics, the Coulomb electrostatic energy between ions (such as Pb^{2+}) within the cell would decrease with the

increase of inter-ionic distance, so that given the fundamental necessity of reducing this energy, a cellular expansion would be beneficial, with outward expansion being limited by the elasticity of the cell wall (Poschenrieder and Barceló, 2004). Hence the increase in spore and vesicle size and vesicle distortion upon exposure to $Pb^{2+}(aq)$ leads one to hypothesize that a substantial concentration of Pb might have accumulated within the spores and within the colonized root with its augmented number of vesicles. This qualitative inference is substantiated by the quantitative elemental analysis results presented in section 3.3.

Further, it is well known that color change is one of the manifestations of the change of chemical composition, with HMs showing a high tendency of forming colored compounds/composites (Bartecki *et al.*, 2000). Fig. 1 shows that the spores acquire a yellowish-red color when exposed to $Pb^{2+}(aq)$. This color is characteristic of the Pb(II)-O bond (Gardner's commercially important chemicals, 2005) and because previous works assert the binding of Pb(II) to the carboxyl groups (Pb-O linkages) of the carbohydrates galactouronic acid and glucuronic acid in the cell wall of plants (Sharma and Dubey, 2005), the inference that emerges is that Pb might be substantially acquired at the cell walls of the spore. Again, this qualitative inference regarding the accumulation of Pb by the spore is substantiated explicitly by the results of the quantitative elemental analysis (section 3.3). González-Guerrero *et al* (2008) observed a color change of the spores of *G. intraradices* to a blue-green when exposed to copper ions ($Cu^{2+}(aq)$) in the *in vitro* culturing medium. They correlated this to the high Cu accumulation in the spores as experimentally determined by them. The blue-green color they inferred as

possibly being a signature of the blue-green compound copper phosphate given the likelihood of the association of Cu with phosphate groups of the cell wall and vacuole.

3.3 Quantitative elemental analysis

3.3.1 Extraradical spores and mycelium (S/M)

The results of pEDXRF analysis on the concentrations of Fe and Pb in the spores and the associated external mycelia (S/M) in the growth medium are shown in Fig. 2. The very low masses of the S/M in the *in vitro* culture precluded the detection of the low energy fluoresced x-rays of P. Notwithstanding the shrinking of the number of replicates by sample pooling (see section 2.3), it will be noted by means of the statistical t-test analysis (Mandel, 1984), that the concentrations of Fe in the S/M between the media with and without the Pb treatment differ significantly at 77.4% confidence level (CL) and correspondingly for Pb at 70.5% CL.

The concentration of $Pb^{2+}(aq)$ in the medium dramatically increased the concentration of Pb in the extra-radical S/M by a factor of 2347.2%. Evidence in the literature supports the binding of Pb predominantly to the HM binding components of the cell wall and plasmalemma of the mycorrhizal root (Galli *et al.*, 1994; Sharma and Dubey, 2005) and plant root cells (Seregin *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2010). Thus the concentration would be expected to scale in a proportionate manner with the increase in surface area of the S/M (greater presentation of sites for attachment). The observed increase of the areas of the S/M in the present work (Table 2) in step with the increase in their internal concentration of Pb, appears to support this HM sequestration mechanism. Further, in analogy with the work of González-Guerrero *et al* (2008), it had been surmised (section 3.2) that the

yellowish-red color of the spores on exposure to elevated concentrations of $\text{Pb}^{2+}(\text{aq})$ suggested their internal Pb accumulation. The quantitative concentration result for Pb presented in fig. 2 confirms this.

Fig. 2 shows however, that the Pb treatment of the medium causes a reduction of the concentration of Fe in the S/M relative to the non-Pb treated case. In the gel medium both Fe and Pb are present as the aqueous ions and therefore would mutually compete for the polar binding sites on the cell walls of the S/M. The number of Pb ions in the medium (section 2.1.2) is greater than the numbers of Fe ions (section 2.1.1), hence Pb is likely to out-compete Fe for adsorptive attachment to the cell wall resulting in a relative decrease in the concentration of Fe in the S/M in the Pb treated medium. It bears noting also that because the numbers of the spores are lower in the Pb treated medium (Table 1) there is a higher proportion of metal ions per spore than in the Pb-free medium, a fact that serves to enhance the competition effect.

3.3.2 Colonized and non-colonized root

Fig. 3 shows the elemental concentrations in the colonized and non-colonized roots as a function of the Pb treatment of the growth medium. Comparing between the Control (Roots-Gi-Pb) and the Pb treated but non-mycorrhizal roots (Roots-Gi+Pb) we observe that the introduction of high ambient mobile Pb (as $\text{Pb}^{2+}(\text{aq})$) compels the plant to absorb more Pb by a factor of 26.72. This Pb is likely attached to the cell wall matrix and plasmalemma with their associated polar compounds (Seregin *et al.*, 2002) with adsorption playing a significant role in the metal binding (Ginn *et al.*, 2008). However even though the presence of P and Fe added to the growth medium as standard nutrients is significant, the (Roots-Gi+Pb) system

evidences diminished P and Fe concentrations by the factors of 0.495 and 0.198 respectively. P is present as orthophosphate ion, $\text{H}_2\text{PO}_4^-(\text{aq})$. The presence of Pb in the system as free $\text{Pb}^{2+}(\text{aq})$ or bound Pb could likely impede the full uptake of P by precipitation or bonding thereby obstructing its cellular affixation and subsequent absorption. The precipitating reaction of $\text{Pb}^{2+}(\text{aq})$ with soluble phosphate based soil amendments has been documented (Maneck *et al.*, 2006). Fe and Pb have been proposed to be 'chemical analogs' as far as plant uptake is concerned (Peer *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 1999). Thus the presence of large concentrations of adsorbed Pb in the root tissue could hamper the normal uptake of the Fe by competing with the latter for absorption at the cellular surface. This antagonism is evident if the uptake of both involves to some degree the cationic forms of the two metals (as noted in section 3.3.1).

Comparing now between the Control and mycorrhizal root in the absence of Pb (Root+Gi-Pb), Fig. 3 demonstrates that both nutrient elements are elevated in concentration as well as the non-nutrient Pb, which is present at residual background levels in the medium. These results for P are in agreement with previous studies (Koide and Kabir, 2000). The root colonization introduces mycorrhizal structures (vesicles, arbuscles and mycelia, VAM) that together with the root cells provide the larger surface area for Pb adsorption (Galli *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2010) leading to an increase in the concentration by a factor of 2.28. However, the larger number of combined cells of the mycorrhized root also provide a greater facility for the uptake of the nutrient elements so that the concentrations of P and Fe show increases by factors of 1.37 and 1.45 respectively. This appears to be a demonstration of the synergistic improvement of root health by mycorrhizal

innoculation (Li *et al.*, 2006).

Finally, we turn to the case of the root-mycorrhizal system grown in the Pb treated medium (Roots+Gi+Pb). In this system the presence of high ambient Pb greatly stimulated the colonization and numbers of almost all mycorrhizal structures (Table 1). Resultingly, the concentrations of Fe and Pb increase dramatically but are more moderate for P. The large number of VAM along with the root cells, afford greatly increased surface area for the adsorption of Pb so that the increase with respect to the (Roots-Gi+Pb) system is now by a factor of 9.18. This spontaneous multiplication of the number of the vesicles and mycelia increases the number of sequestration sites of the mobile Pb^{2+} cations in the apoplast. This serves to ameliorate the toxic effects of the large ingress of Pb onto the root cells which otherwise would have resulted in the absence of such multiplication. Such a multiplication could be the driving response to ambient HM stress by the mycorrhizal system. This response to high ambient Pb suggests that *G. intraradices* is tolerant to Pb contamination – an observation that is consistent with those of previous authors, who found an increase of Pb in roots colonized by *G. intraradices* in comparison with *Glomus mosseae* (Wong *et al.*, 2007).

The very large number of vesicles and mycelia together with the root cells would serve to dilute the competition (see 3.3.1) between the Pb and Fe cations present in the apoplastic fluid so that the absorption of Fe would be greatly facilitated despite of the large presence of $Pb^{2+}(aq)$. Thus the Fe concentration increases by a factor of 20.52 in the (Roots+Gi+Pb) as compared to the (Root-Gi+Pb) system. This shows the synergistic effect of root colonization by the mycorrhizal fungus in counteracting Pb toxicity and conferring greater Pb stress

resistance to the root.

The importance of Fe as a nutrient implies that the mycorrhized root has evolved specific molecular transporters for intracellular absorption so that Fe would not be restricted as in the case of Pb to mainly superficial cell wall adhesion (Briat and Lobreaux, 1997). This would imply that the greater number cells of the symbiotic system (mycorrhizal structures plus root cells) allows volume filling of Fe within the cells to take place as against surface adsorption, which in turn translates to a relatively greater number of Fe species absorbed by the Root+Gi+Pb system. This might play a part in the increase in Fe concentration by 20.52 times whereas for Pb it is a 9.18 fold increase.

A high level of Fe has been found in roots growing in HM contaminated soils (Turnau *et al.*, 1993). From an eco-physiological standpoint, this and our results suggest that mycorrhizal fungi could protect their hosts by increasing Fe levels inside the roots. In terms of the possible mutual interactions between the Fe and Pb, it has been found that associations between Pb and Fe-Mn oxides are relatively stable in soil (Wong *et al.*, 2002), thereby, these same associations may occur inside the mycorrhizal roots, which could be a factor towards the decrement of the toxicity by Pb. Dekock (1981) has proposed Fe as an element that alleviates heavy metal toxicity.

The concentration of P of the (Roots+Gi+Pb) is higher than the (Roots-Gi+Pb) system by a factor of 2.17 but is lower than the (Roots+Gi-Pb) system by 0.78. The large number of the combined VAM and root cells, increase the P absorption in the case of (Roots+Gi+Pb) thereby mitigating somewhat the effect of Pb on the decrement of P availability (as discussed before). However, the large presence of

Pb in the medium perhaps cannot be completely nullified leading to the slight depreciation in P concentration as compared to the (Roots+Gi-Pb) system. This finding is contrary to previous works that report that the beneficial effect of mycorrhizal fungi in the presence of Pb is due to the improvement of phosphorus uptake (Andrade *et al.*, 2004) and that this element may thus act as detoxifying agent by dilution or precipitation onto polyphosphate granules (Rabie, 2005). While such reactions are not contra-indicated *per se*, the results of this work suggest that Fe rather than P might have a more useful role in the detoxification of Pb in Pb stressed mycorrhized roots. The observation by Galli *et al* (1994) that polyphosphate granules may likely be 'artifacts of specimen preparation' rather than the binding substances for HM sequestration, also appears to support to this inference.

3.3.3 *pEDXRF and the analysis of mycorrhizal spores and mycelium*

The elemental analysis for low mass samples and for low atomic number (Z) elements (in this work, P) is made possible by the improvements, which the polarization of the primary x-ray beam brings to this bench-top EDXRF system. This relatively new technique allows a lowering of the scattered photon background, enabling a higher sensitivity even in non-evacuated systems. This is particularly beneficial for the lower Z elements important to biological samples (Perring and Blanc, 2007). The standard-less TQ-powder routine automatically corrects for matrix effects (Schramm and Heckel, 1998), which would otherwise have been difficult to achieve for the complex specimens of this work. These factors couple favorably to the traditional advantages of bench-top EDXRF compared to other high energy photon spectrometric techniques, although it cannot

provide spatial elemental mapping. This work represents possibly the first report of quantitative elemental analysis of small mass mycorrhizal structures such as the S/M using pEDXRF.

3.4 *Phytoremediation potential*

Mycorrhizal fungi have been used for the phytoremediation of contaminated soils. It has been observed that Pb is highly immobilized in mycorrhizal roots (Vogel-Mikuš *et al.*, 2005; Arriagada *et al.*, 2007), thus aiding the phytostabilization of Pb contaminated soil. As noted in the preceding, the *D. carota* L. roots inoculated with *G. intraradices* absorbed a high level of Pb from the 'contaminated' medium as compared to the non-inoculated roots. The efficiency of phytoremediation is generally quantified by the Bio-concentration Factor (BCF) defined as the ratio of the concentration of the HM in the organism to its concentration in the soil/substrate (Reeves and Baker, 2000). The BCF indicates how well the organism is able to take-up metal from a given concentration in the environment, per growth cycle. The results for the S/M are shown in Fig. 4. Even though the S/M in the Pb treated medium had absorbed a higher concentration of Pb (Fig. 2) its BCF is lower than the value for the case where no Pb had been applied. The Pb concentration on a dry mass basis for the Pb-spiked medium used in this work was found to be quite high (3703.22 mg.kg⁻¹).

The BCF response of the organism exposed to such high concentrations of the HM (Pb) follows the expected pattern of diminishing sensitivity, which has been previously presented as a manifestation of the Le Chatelier-Braun thermodynamic principle (Dasgupta-Schubert *et al.*, 2007). This general principle (Prigogine and Defay, 1954) states that a chemical system responds in a way that minimizes the

applied external forces. Thus at high elemental concentrations of the external medium the BCF would be expected to be lower than at lower concentrations, though the point at which the BCF would be < 1.0 (inefficient phytoremediator) would vary from system to system.

From Fig. 4 it is clear that the extra-radical S/M are poor vehicles of phytoremediation. The situation changes within the plant (Fig. 5) where the synergistic enhancement of concentrations as shown in Fig. 3, leads to higher BCFs in the symbiotic system as compared to the corresponding non-mycorrhizal roots for all three elements. The case for Pb in the (Root+Gi+Pb) system seems anomalous given the high concentrations of Pb in this system (Fig. 3) but here again by the Le Chatelier-Braun principle, the response diminishes to reach below the value for the (Root+Gi-Pb) system where the ambient (background) Pb concentration was much lower. The corresponding values for Fe and P in the same system maintain their relatively high BCF values, again because the external medium concentrations of these elements (on a dry mass basis) were much lower than for Pb ($146.57\text{mg P.kg}^{-1}$ and $75.33\text{mg Fe.kg}^{-1}$ respectively). Thus at high ambient concentrations of the HM (Pb), mycorrhizal *D. carota* L. transformed carrot roots even though capable of sequestering high tissue concentrations of the HM, are not very efficient at the removal of the HM from the environment. However at lower concentrations its overall phytoaccumulation efficiency for both toxic and nutrient elements improves. Future studies for the enhancement of phytoremediation efficiencies therefore, might envision amplifying the ambit of this study to include high-accumulating plants coupled with the appropriate mycorrhizal strain. It is worth mentioning that a calculation of the BCFs of Pb in other

mycorrhizal-plant systems such as the system used by Zhang *et al* (2010), corroborates the expectation (of diminishing returns) based on the universal Le Chatelier-Braun principle.

4. Conclusions

The increase in the percentage colonization shows the ability of mycorrhizal fungi to grow in contaminated soils. Pb treatment increased the percentages of mycorrhizal colonization, vesicles and mycelia, although the number of the spores decreased. The mycorrhizal system in the Pb spiked medium showed relatively the highest concentrations of Fe and Pb in the roots and a high concentration of Pb in the spores and mycelia. The high Fe concentrations of the *D. carota-G. intraradices* system under Pb stress, indicates a synergistic relationship between the AM fungus and the host and the induction of higher Pb tolerance by the fungus to the host, possibly through higher Fe absorption. Thus, the protective effect of AM fungi against heavy metal toxicity in roots appears to be based on the number and size of fungal structures with reduced metabolic activity, such as the vesicles.

Acknowledgements

The authors thanks Dr. S.E. Borjas of the Laboratorio de Radiación, Instituto de Física y Matemáticas and MC. L. Carreto of the Instituto de Investigaciones Químico Biológicas of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México, for technical help. The doctoral fellowship of CJA was made available through grant n° 168355 of CONACyT, Mexico.

References

Alvarado, C.J.; Abuhani, W.A.; Whelan, T.; Castillo, O.S.; Villaseñor, L.M.; Borjas, S.E.; Landsberger, S.; Bribiesca, S.L.; Alexander, S.; Dasgupta-Schubert, N. (2011). Multilaboratory and multitechnique analysis of the lead and copper concentrations in metal accumulating plants with or without mycorrhizal symbiosis. *Env. Sci and Poll. Res.* (*submitted*).

Alvarado, C.J.; Dasgupta-Schubert, N.; Ambriz, E.A.; Sanchez-Yañez, J.M.; Villegas, H.J., (2011). Hongos micorrizicos arbusculares y la fitoremediación del plomo. (*In Spanish*). *Rev. Int. Cont. Ambiental*, 27 (4), 357-364 (**8 pages**)

Andrade, S.A.L.; Abreu, C.A.; De Abreu, M.F.; Silveira, P.D., (2004). Influence of lead additions on arbuscular mycorrhiza and Rhizobium symbioses under soybean plants. *Appl. Soil Ecol.*, 26, 123–131 (**9 pages**).

Arriagada, C.A.; Herrera, M.A.; Ocampo, J.A., (2005). Contribution of arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi to the tolerance of Eucalyptus globulus to Pb. *Water Air Soil Pollut.*, 166, 31–47 (**17 pages**).

Arriagada, C.A.; Herrera, M.A.; Ocampo, J.A., (2007). Beneficial effect of saprobe and arbuscular mycorrhizal fungi on growth of Eucalyptus globulus co-cultured with Glycine max in soil contaminated with heavy metals, *J. Environ. Manag.* 84, 93–99 (**7 pages**).

Bartecki, A.; Burgess, J.; Kurzak, K., (2000). *Colour of Metal Compounds*, Gordon-Breach Science Publishers. Australia.

Bécard, G.; Fortin, J.A., (1988). Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots *New Phytol.*, 108, 211–218 (**8 pages**).

Biermann, B.; Linderman, R.G., (1981). Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizae: a proposed method towards standardization. *New Phytol.*, 87, 63–67 (**5 pages**).

Briat, J.F.; Lobreaux, S., (1997). Iron transport and storage in plants. *Trends Plant Sci.* 2, 187–193 (**7 pages**).

Castillo, O.S.; Dasgupta-Schubert, N.; Alvarado, C. J.; Zaragoza, E.M.; Villegas, H.J., (2011). The effect of the symbiosis between *Tagetes erecta* L. (marigold) and *Glomus intraradices* in the uptake of Copper (II) and its implications for phytoremediation. *New Biotechnol* (*in press*) doi:10.1016/j.nbt.2011.05.009.

Dasgupta-Schubert, N.; Whelan, T.; Reyes, M.A.; Lloren, C.; Brandt, T.T.; Persans, M.W., (2007). Light quanta modulated characteristics of Ni uptake by *Brassica juncea* seedlings: The interdependence of plant metal concentrations and biomass, *Int. J. Phytoremed.* 9, 207–225 (**19 pages**).

Declerck, S.; Strullu, D-G.; Fortin, A., (2005). (Eds.), In vitro culture of mycorrhizas. Series: Soil Biology, Vol. 4, Springer-Verlag, Berlin.

Dekock, P.C., (1981). Iron nutrition under conditions of stress. *J. Plant Nutr.* 3, 513–521 (**9 pages**).

Del Val, C.; Barea, J.M.; Azcón-Aguilar, C., (1999). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 718–723 (**6 pages**).

Dong, Y.; Ma, L.Q.; Rhue, R.D., (1999). Relation of enhanced Pb solubility to Fe partitioning in soils. *Environ. Pollut.*, 110, 515–522 (**8 pages**).

Fu, J.; Zhou, Q.; Liu, J.; Liu, W.; Wang, T.; Zhang, Q.; Jiang, G., (2008). High levels of heavy metals in rice (*Oriza sativa* L.) from a typical E-waste recycling area southeast China and its potential risk to human health. *Chemosphere*, 71, 1269–1275 (**7 pages**).

Galli, U.; Schuepp, H.; Brunold, C., (1994). Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiol. Plant.* 92, 364–368 (**5 pages**).

Gardner's commercially important chemicals. Ed. G.W.A. Milne, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2005.

Garg, N.; Chandel, S., (2010). Arbuscular mycorrhizal networks: process and functions. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30, 581-599 (**19 pages**).

Gaur, A.; Adholeya, A., (2004). Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *Current Science*, 86, 528-534 (**7 pages**).

Giasson, P.; Jaouich, A.; Cayer, P.; Gagné, S.; Moutoglis, P., Massicotte, L., (2006). Enhanced phytoremediation: A study of micrrhizoremediation of heavy metal-contaminated. soil. *Remediation*, 17, 97-110 (**14 pages**).

Ginn, B.R.; Szymanowski, J.S.; Fein, J.B., (2008). Metal and proton binding onto the roots of *Fescue rubra*, *Chemical Geology* 253, 130–135 (**6 pages**).

González-Guerrero, M.; Melville, L.H.; Ferrol, N.; Lott, J. N.A.; Azcón-Aguilar, C.; Peterson, R.L., (2008). Ultrastructural localization of heavy metals in the extra-radical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Can. J. Microbiol.*, 54, 103-110 (**8 pages**).

Joner, E.; Briones, R.; Leyval, C., (2000). Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant Soil* 226, 227–234 (**8 pages**).

Koide, R. T.; Kabir, Z., (2000). Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytol.*, 148, 511–517 (**7 pages**).

Koul, M.; Kapoor, R.; Luikham, N., (2001). Influence of lead in soil on mycorrhizal development and plant growth of *Cyamopsis tetragonoloba* (Linn.) Taub. *Indian. J. Exp. Biol.* 39, 459–463 (**4 pages**).

Li, H.; Smith, S.E.; Holloway, R.E.; Zhu, Y.; Smith, F.A., (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to phosphorus uptake by wheat grown in a phosphorus-fixing soil even in the absence of positive growth responses. *New Phytol.* 172, 536–543 (**8 pages**).

Malcová, R.; Vosátka, M.; Gryndler, M., (2003). Effects of inoculation with *Glomus intraradices* on lead uptake by *Zea mays* L. and *Agrostis capillaries* L., *Appl. Soil Ecol.*, 23, 55–67 (**13 pages**).

Mandel, J., (1984). *The Mathematical Framework of Statistics Part. II*, in: *The statistical analysis of experimental data*, Dover Publications, New York.

Maneck, M.; Bogucka, A.; Bajda, T.; Borkiewicz, O., (2006). Decrease in Pb bioavailability in soils by addition of phosphate ions. *Environmental Chemistry Letters* 3, 178–181 (**4 pages**).

Meharg, A.A.; Cairney, J.W.G., (2000). Co-evolution of mycorrhizal symbionts and their hosts to metal-contaminated environments. *Adv. Ecol. Res.*, 30, 69–112 (**44 pages**).

Nowak, J., (2007). Effects of cadmium and lead concentrations and arbuscular mycorrhiza on growth, flowering and heavy metal accumulation in scarlet sage (*Salvia splendens* sello “Torreador”). *Acta Agrobot.*, 60, 79–83 (**5 pages**).

Pawlowska, T.E.; Chavat, I., (2004). Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 6643–6649 (**7 pages**).

Peer, W.A.; Baxter, I.R.; Richards, E. L.; Freeman, J.L.; Murphy A.S., (2005). *Topics in Current Genetics*. M.J. Tamás, E. Martinoia (Eds): *Molecular biology of metal homeostasis and detoxification*. Springer-Verlag, Berlin, 14, 299-340 (**42 pages**).

Pilon-Smits, E., (2005). Phytoremediation, *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 15–39 (**25 pages**).

Poschenrieder, C.; Barceló, J., (2004) Chapter 10 Water relations in heavy metal stressed plants, in: M.N.V. Prasad (Ed.), Heavy Metal Stress in Plants. From Biomolecules to Ecosystems, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 249–270 (**22 pages**).

Perring, L.; Blanc, J., (2007). EDXRF determination of iron during infant cereals production and its fitness for purpose. *Int. J. Food Sci. Technol.* 42, 551–555 (**5 pages**).

Prigogine, I.; Defay, R., (1954). *Chemical Thermodynamics*, Longmans-Green, London.

Rabie, G.H., (2005). Contribution of arbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance growth in heavy metal-polluted soils. *Afr. J. Biotechnol.* 4, 332–345 (**14 pages**).

Reeves, R.D.; Baker, A.J.M., (2000). Metal accumulating plants, in: I. Raskin, B.D. Ensley (Eds.), *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment*. Wiley, New York, 193–229 (**17 pages**).

Schulin, R.; Curchod, F.; Mondeshka, M.; Daskalova, A.; Keller, A., (2007). Heavy metal contamination along a soil transect in the vicinity of the iron smelters of Kremikovtzi (Bulgaria). *Geoderma* 140, 52–61 (**10 pages**).

Schramm, R.; Heckel, J., (1998). Fast analysis of traces and major elements with ED(P)XRF using polarized x-rays: TURBOQUANT. *Journal de Physique IV France*, 8, 335–342 (**8 pages**).

Seregin, I.V.; Pekhov, V.M.; Ivanov, V.B., (2002). Plasmolysis as a Tool to Reveal Lead Localization in the Apoplast of Root Cells. *Russ. J. Plant Physiol.* 49, 283–285 (**3 pages**).

Sharma P.; Dubey R.S., (2005). Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 17, 35-52 (**18 pages**).

Smith, S.E.; Read, D.J., (2008). *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd Ed, Academic Press, Amsterdam-London.

Sudová, R.; Pavlíková, D.; Macek, T.; Vosátka, M., (2007). The effect of EDDS chelate and inoculation with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on the efficacy of lead phytoextraction by two tobacco clones. *Appl. Soil Ecol.*, 35, 163–173 (**11 pages**).

Turnau, K.; Kottke, I.; Oberwinkler, F., (1993). Element localization in mycorrhizal roots of *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn collected from experimental plots treated with cadmium dust. *New Phytol.* 123, 313–324 (**12 pages**).

United Nations Environment Programme, Harmful Substances, <http://www.unep.org/hazardoussubstances/>, last accessed August 2011.

Vierheilig, H.; Coughlan, A.P.; Wyss, U.; Piché, Y., (1998). Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 5004–5007 (**4 pages**).

Vogel-Mikuš, K.; Drobne, D.; Regvar, M., (2005). Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. *Environ. Pollut.*, 133, 233–242 (**10 pages**).

Vogel-Mikuš, K.; Pongrac, P.; Kump, P.; M. Nečemer, Regvar, M. (2006). Colonisation of a Zn, Cd and Pb hyperaccumulator *Thlaspi praecox* Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake. *Environ. Pollut.*, 139, 362–371 (**10 pages**).

Wong, C.C.; Wu, S.C.; Kuek, C.; Khan, A.G.; Wong, M.H., (2007). The role of mycorrhizae associated with vetiver grown in Pb-/Zn-contaminated soils: greenhouse study. *Restor. Ecol.* 15, 60–67 (**8 pages**).

Wong, S.C.; Li, X.D.; Zhang, G.; Qi, S.H.; Min, Y.S., (2002). Heavy metals in agricultural soils of the Pearl River Delta, South China. *Environ. Pollut.*, 119, 33–44 (**12 pages**).

Zeng, L.S.; Liao, M.; Chen, C.L.; Huang, C.Y., (2007). Effects of lead contamination on soil enzymatic activities, microbial biomass, and rice physiological indices in soil- lead- rice (*Oryza sativa* L.) system. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 67, 67–74 (**13 pages**).

Zhang, H.H.; Tang, M.; Chen, H.; Zheng, C.L.; Niu, Z.C., (2010). Effect of inoculation with AM fungi on lead uptake, translocation and stress alleviation of *Zea mays* L. seedlings planting in soil with increasing lead concentrations. *Euro. J. Soil Biol.*, 46, 306–311 (**6 pages**).

Tables

Table 1: Effect of lead (Pb) on the percentage of mycorrhizal colonization and the percentage of vesicles, mycelia and arbuscules in transformed carrot roots. The roots were inoculated with *Glomus intraradices* and grown in an *in vitro* system. %C = Percentage of colonization, %V = Percentage of vesicles, %M = Percentage of mycelia, %A = Percentage of arbuscules, -M-Pb = Non-mycorrhizal inoculated treatment without lead (Pb), +M-Pb = inoculated treatment without Pb, +M+Pb = inoculated treatment with Pb. Data shown are the means with associated standard errors over the n observations.

Treatments	%C	%V	%M	%A
-M-Pb	0.0	0.0	0.0	0.0
+M-Pb	48±15.9 (n=3)	0.3±0.1 (n=3)	83±5.0 (n=3)	50±5.0 (n=3)
+M+Pb	62±10.6 (n=3)	1.3±0.1 (n=3)	90±5.0 (n=3)	47±5.0 (n=3)

Table 2: Mean values of the number of AMF spores, area of AMF spores and the area of the vesicles, as affected by the application of lead. -M-Pb = Non-mycorrhizal inoculated treatment without lead (Pb), +M-Pb = inoculated treatment without Pb, +M+Pb= inoculated treatment with Pb. Data shown are the means with associated standard errors over the n observations.

Treatments	AMF number (spores cm ⁻²)	Area of AMF spores (spores spores (μm ² spore ⁻¹) ¹)	Area of vesicles (mm ² vesicles ⁻¹)
-M-Pb	0.0	0.0	0.0
+M-Pb	91±16.4 (n=10)	4480±1200 (n=4)	0.138±0.01 (n=4)
+M+Pb	79±15.3 (n=16)	7000±1300 (n=8)	0.161±0.02 (n=8)

Figure captions

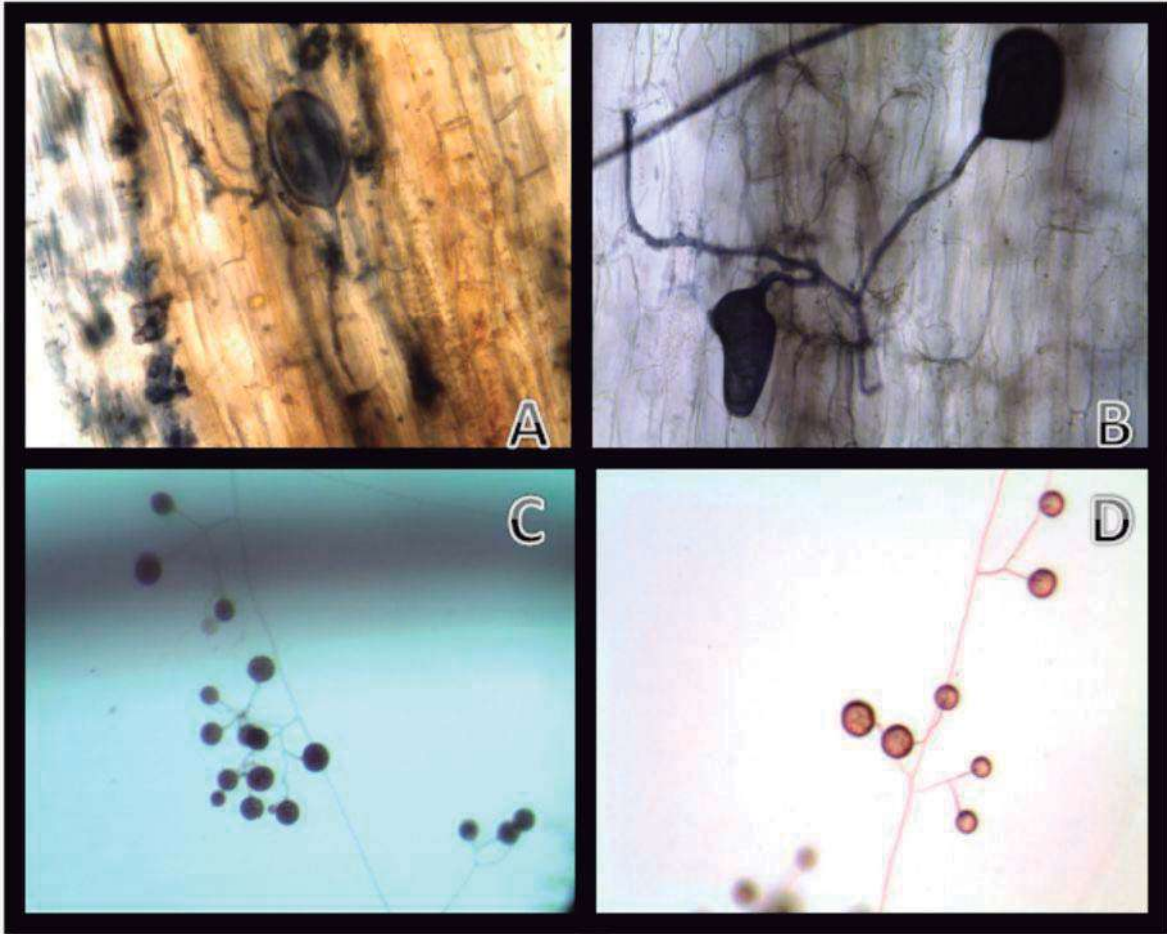


Fig. 1: Optical microscopic images (40X) of the roots (A and B) of transformed *D. carota* colonized by the arbuscular mycorrhiza (AM) *Glomus intraradices* and the stereo-microscopic images (10X) of the AM spores (C and D) as affected by the absence (A and C) or presence (B and D) of Pb in the growth medium. The arrows indicate the vesicles (A and B) and spores (C and D). High ambient Pb concentration deforms the vesicular shape (B) from the ovoid (A) while extraradically, the spores lighten in opacity, change color to yellowish-red and distend (D) as compared to the spores in the absence of ambient Pb (C).

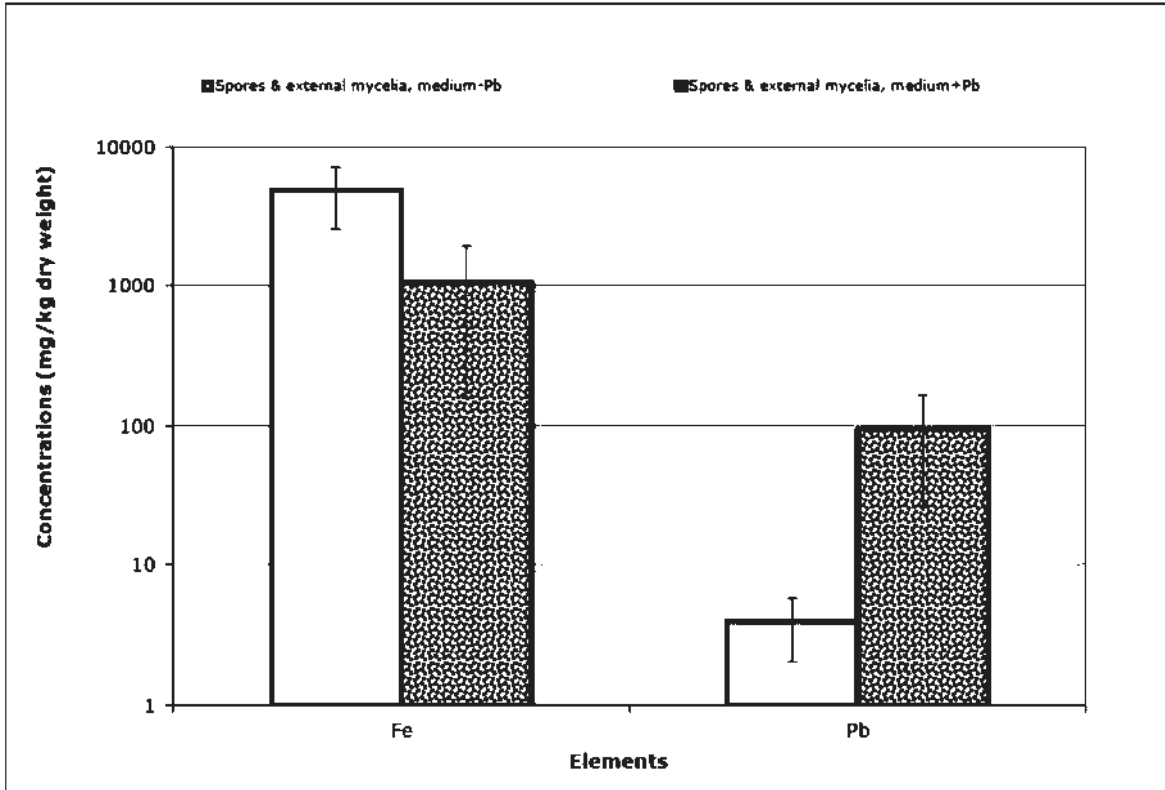


Fig. 2. The concentrations of Fe and Pb in the spores and external mycelia in the growth medium without Pb treatment (unfilled bars, 2-sigma error) and with Pb treatment (filled bars). (log scale).

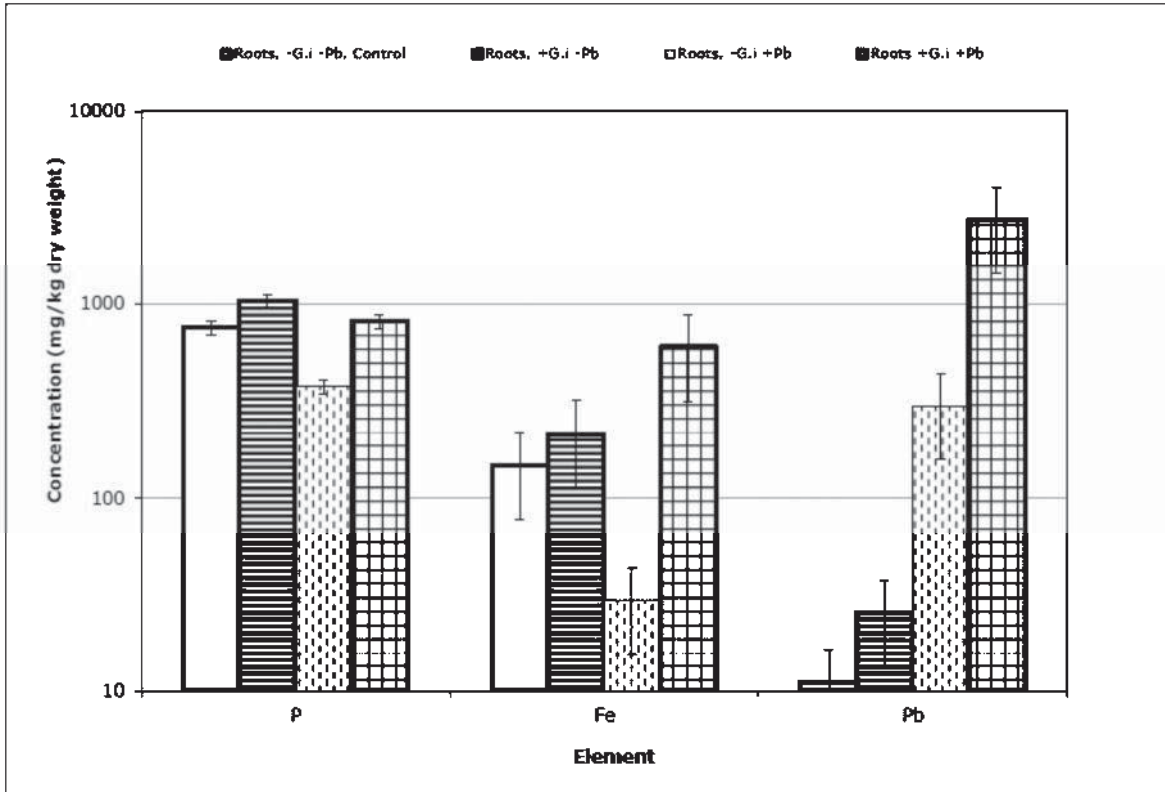


Fig. 3 Elemental concentrations in the *in vitro* cultures of the *D. carota* transformed roots inoculated with or without the *G. intraradices* (Gi) and spiked with or without lead (Pb) leading to the specimens Roots-Gi-Pb (Control) (unfilled), Roots+Gi-Pb (horizontal lines), Roots-Gi+Pb (vertical dashes) and Roots+Gi+Pb (cross-hatched). (log scale).

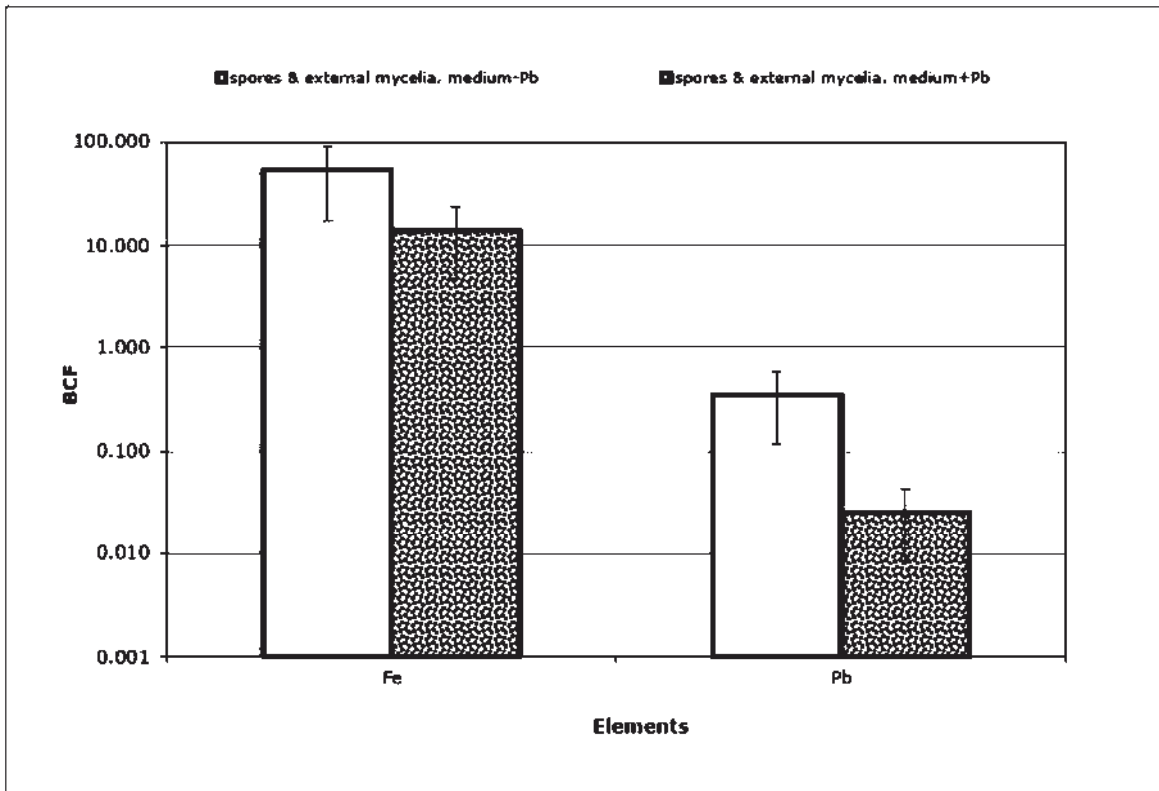


Fig. 4. Bio-concentration factors (BCF) in the spore and extra radical mycelia specimens in media with and without Pb. Bar-design identification as in fig. 2.

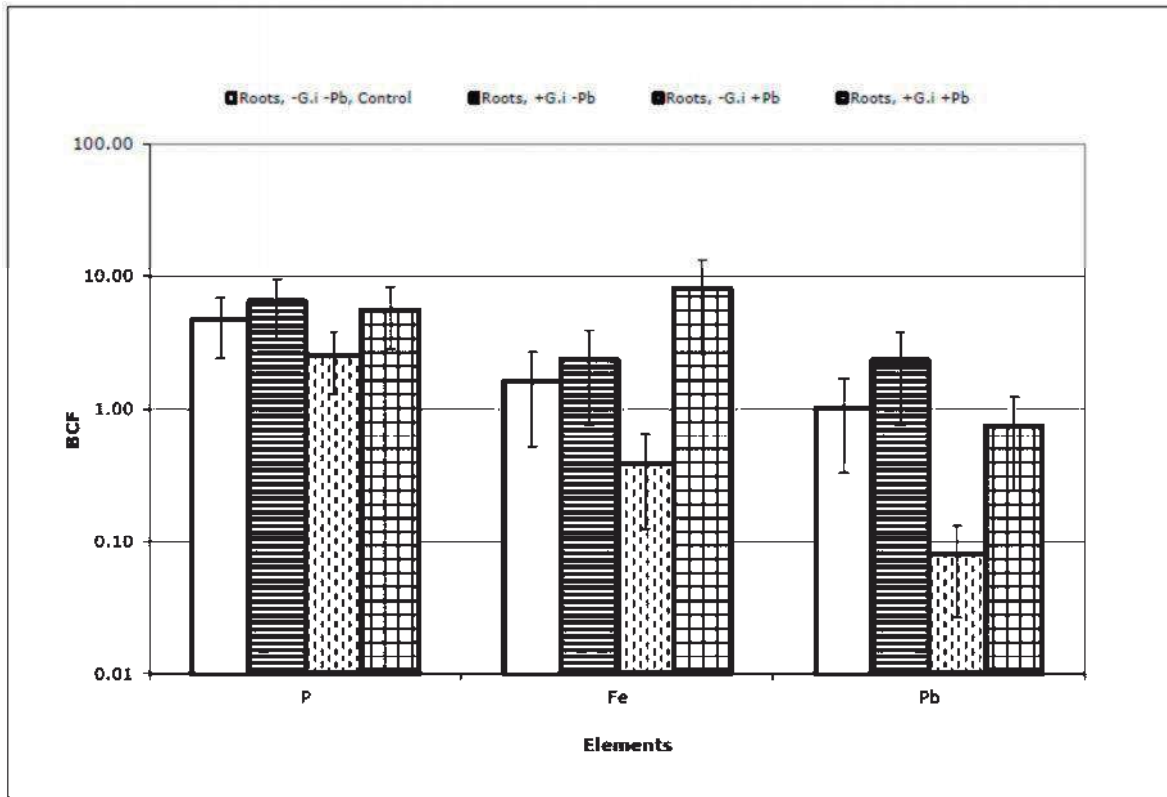


Fig. 5. Bio-concentration factors (BCF) for the elements in the different specimens as described in Fig. 3. Bar-design identification as in fig.3.

3.2 DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO.

Durante la etapa de crecimiento las condiciones ambientales se mantuvieron aproximadamente constantes, teniendo una humedad relativa de $56.5 \pm 5\%$ y una temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. El fotoperiodo fue de 16hrs con una intensidad de luz de 4400 ± 570 lúmenes.

Las plantas fertilizadas con NH_4 presentaron un buen desarrollo, sin embargo, las plantas $\text{nM+Pb+NH}_4(2)$ empezaban a presentar hojas secas en la parte inferior, además de presentar un desarrollo radicular menor comparadas con las $\text{nM-Pb+NH}_4(1)$. Las plantas $\text{M-Pb+NH}_4(3)$ presentaron un mayor tamaño comparadas con las $\text{M+Pb+NH}_4(4)$. **Figura 13.**

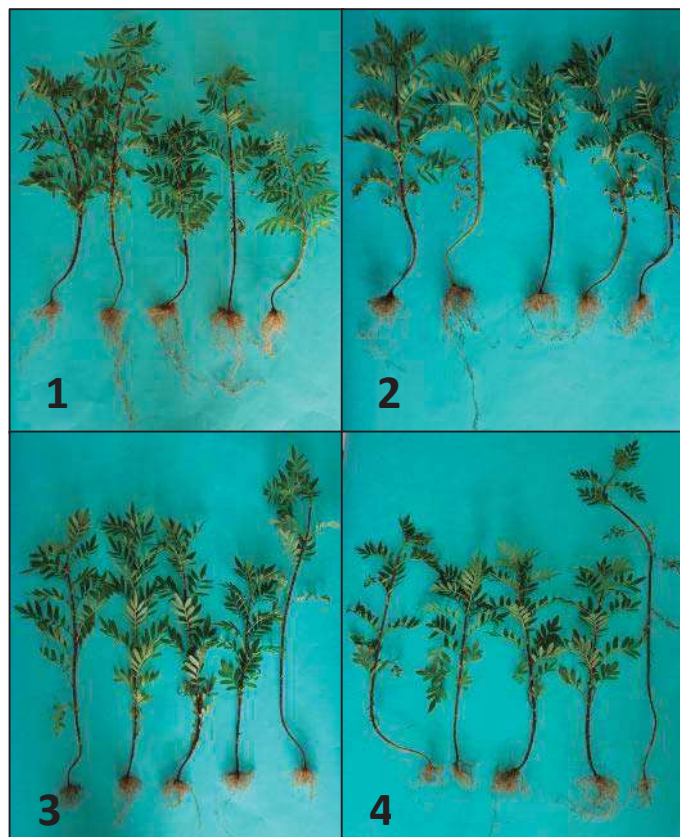


Figura 13. Imágenes de plantas de *Tagetes erecta* crecidas durante 9 semanas y fertilizadas con NH_4 inoculadas (3 y 4) y sin inocular (1 y 2) con *Glomus intrarradices* y con Pb (2 y 4) y sin Pb (1 y 3). 1) nM-Pb+NH_4 , 2) nM+Pb+NH_4 , 3) M-Pb+NH_4 y 4) M+Pb+NH_4 .

Las plantas fertilizadas con NO_3 también presentaron un buen desarrollo y crecimiento. Las plantas no micorrizadas y en presencia de Pb ($\text{nM}+\text{Pb}+\text{NO}_3(2)$) son de menor tamaño que las $\text{nM}-\text{Pb}+\text{NO}_3(1)$. Las plantas micorrizadas crecieron satisfactoriamente y presentan unas hojas más grandes y saludables ($\text{M}-\text{Pb}-\text{NO}_3(3)$), por otro lado, las plantas $\text{M}+\text{Pb}+\text{NO}_3(4)$ son más grandes y delgadas.

Figura 14.

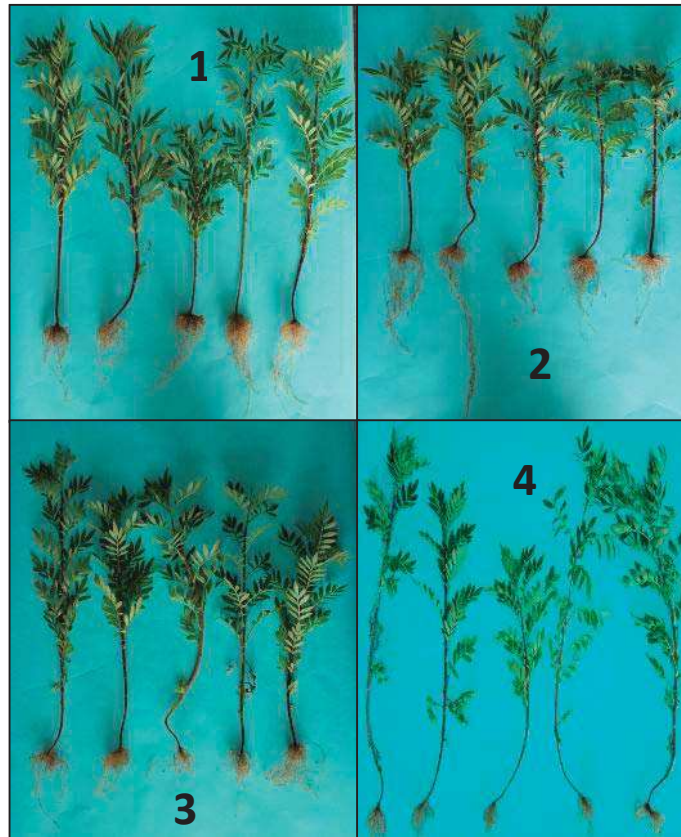


Figura 13. Imágenes de plantas de *Tagetes erecta* crecidas durante 9 semanas y fertilizadas con NO_3 inoculadas (3 y 4) y sin inocular (1 y 2) con *Glomus intrarradices* y con Pb (2 y 4) y sin Pb (1 y 3). 1) $\text{nM}-\text{Pb}+\text{NO}_3$, 2) $\text{nM}+\text{Pb}+\text{NO}_3$, 3) $\text{M}-\text{Pb}+\text{NO}_3$ y 4) $\text{M}+\text{Pb}+\text{NO}_3$.

La evaluación del porcentaje de micorrización por tinción de las raíces y el análisis al microscopio de las mismas, mostró que, para ambas fuentes de nitrógeno existió una buena colonización, además se encontró un aumento en la cantidad de vesículas en las raíces que crecieron en presencia de Pb (2 y 3).

Figura 14.

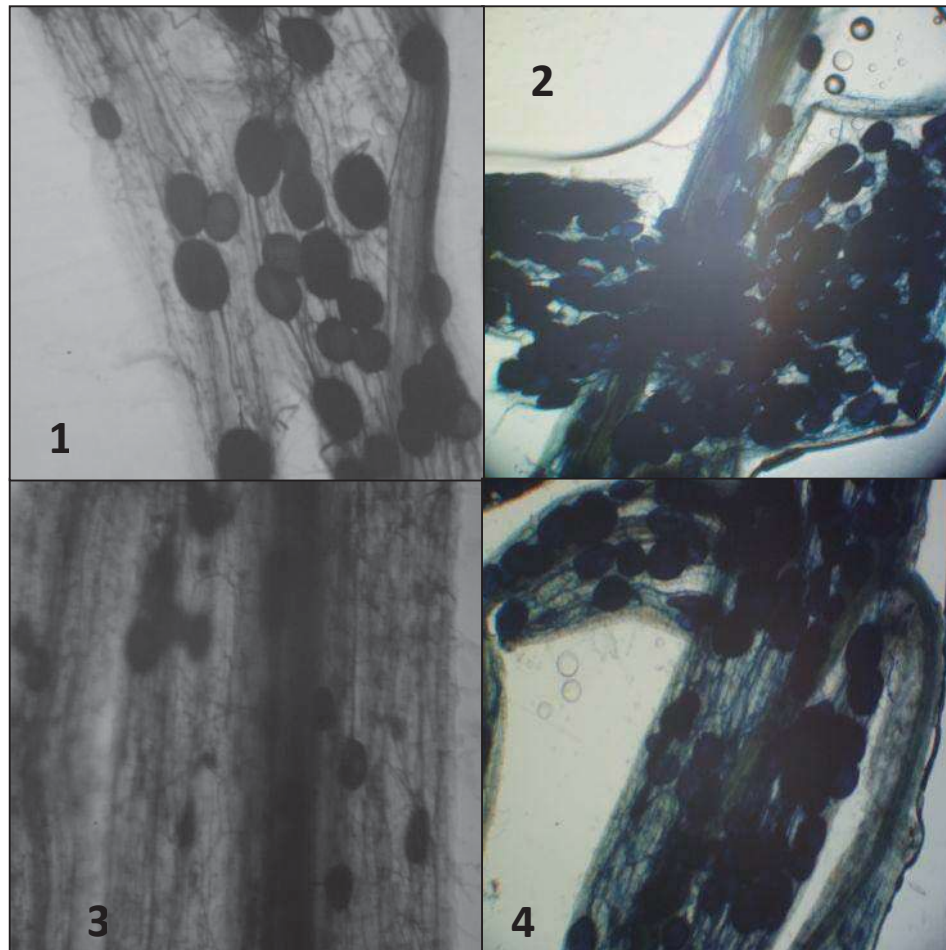


Figura 14. Imágenes de raíces de plantas de *Tagetes erecta* crecidas durante 9 semanas y fertilizadas con NH_4 (1 y 2) y NO_3 (3 y 4) inoculadas con *Glomus intrarradices*, con Pb (2 y 4) y sin Pb (1 y 3). 1) M-Pb+ NH_4 , 2) M+Pb+ NH_4 , 3) M-Pb+ NO_3 y 4) M+Pb+ NO_3 .

Se logró tener porcentajes por encima del 60% de colonización en todos los casos. Por otro lado, existió una aparente disminución en el porcentaje de colonización en la presencia del Pb, esto puede indicar efectos de estrés del hongo por presencia del Pb. **Figura 15.**

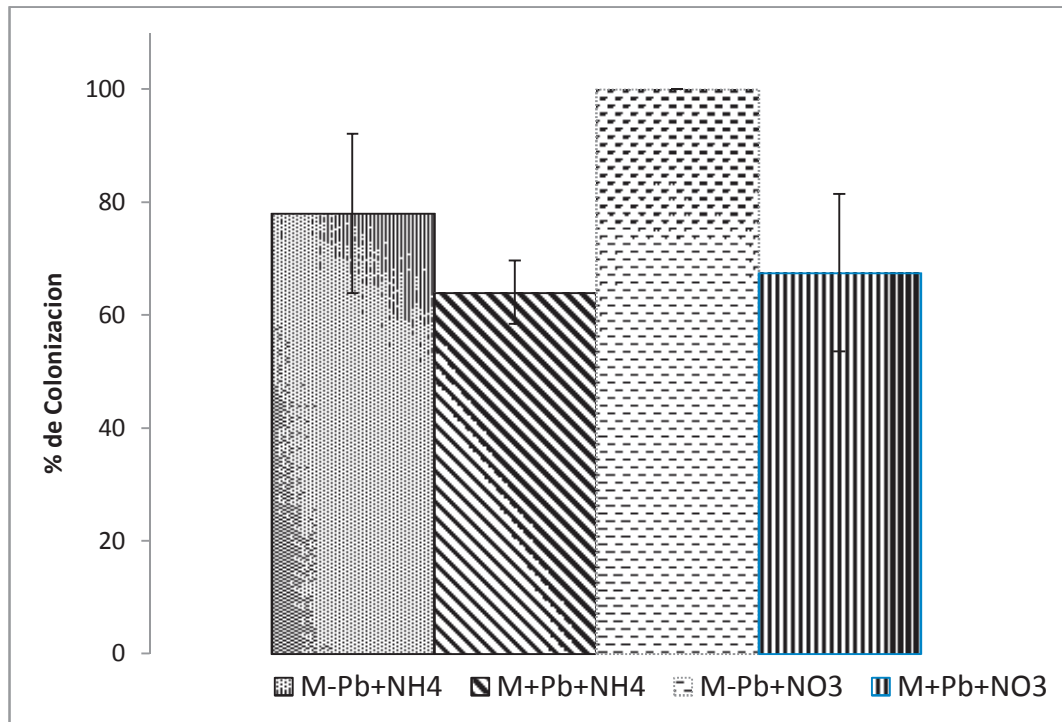


Figura 15. Porcentaje de colonización en plantas de *Tagetes erecta*, fertilizadas con NH₄ y NO₃ inoculadas (M) con el HMA *Glomus intrarradices*, crecidas en macetas de 50g, con una N=5.

El análisis de las muestras de tejido de planta para cuantificar la cantidad de Pb extraído (Mp), se realizó primero analizando la concentración de Pb en las partes aéreas y raíces (C_{pPA} y C_{pPR}) para después calcular la concentración en la planta entera (C_p).

La mayor concentración de Pb se encontró en las raíces (C_{pPR}), comparado con la concentración en la parte aérea (C_{pPA}) para todos los tratamientos. No se apreció diferencia significativa entre los tratamientos en el C_{pPA} , alcanzando una concentración máxima de alrededor de $120\mu\text{g}$ de Pb/g de materia seca. **Figura 16.**

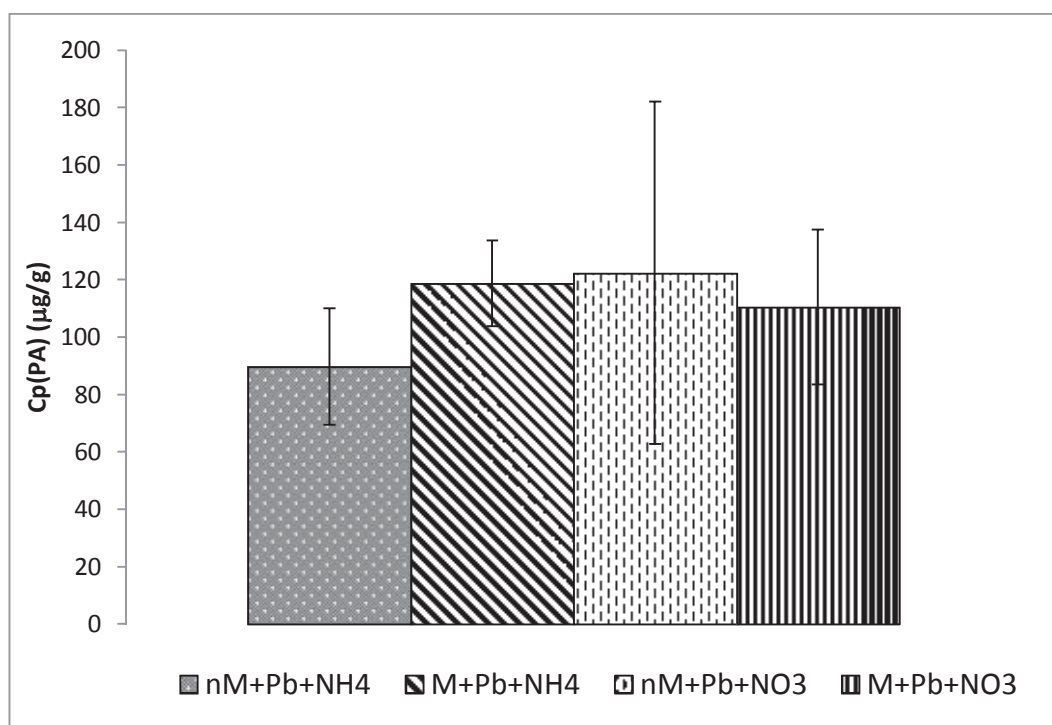


Figura 16. Concentración de Pb en parte aérea, C_{pPA} de plantas de *Tagetes erecta*, fertilizadas con NH_4 y NO_3 inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices*, crecidas en macetas de 50g, con un número de réplicas (N)=5.

Para el C_{pPR} , los tratamientos micorrizados ($M+Pb+NO_3^-$, $M+Pb+NH_4^+$) presentaron un incremento en la concentración de Pb comparado con los tratamientos no micorrizados ($nM+Pb+NO_3^-$, $nM+Pb+NH_4^+$). **Figura 17.**

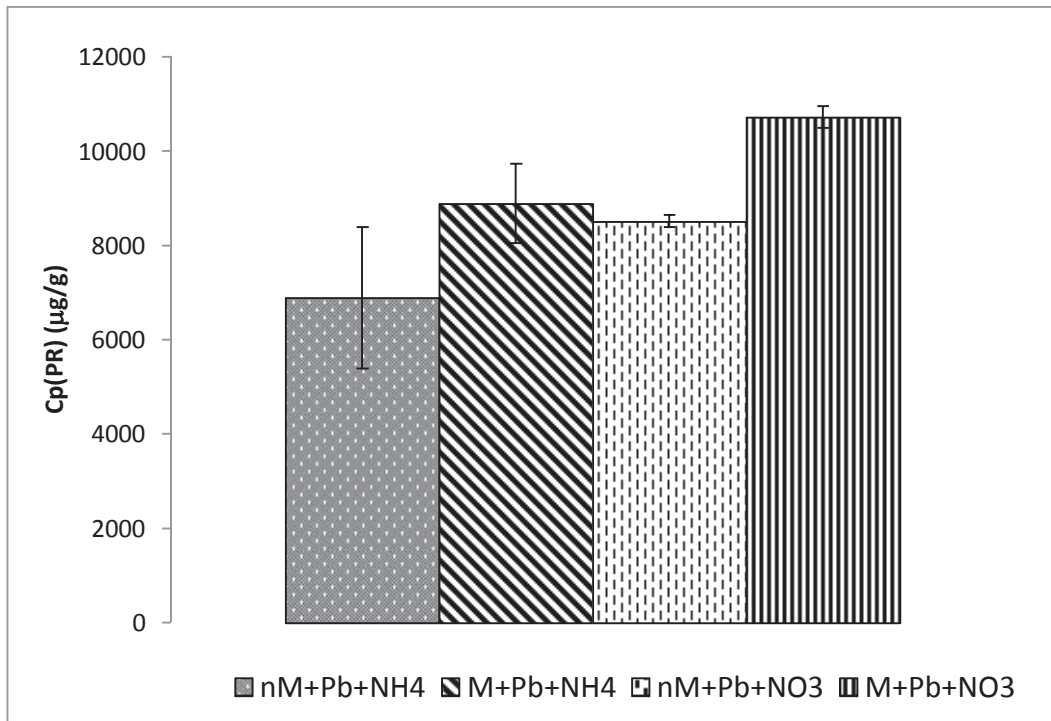


Figura 17. Concentración de Pb en parte raíz, C_{pPR} de plantas de *Tagetes erecta*, fertilizadas con NH_4 y NO_3 inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices*, crecidas en macetas de 50g, con un número de réplicas (N)=5.

Al realizar el análisis de la concentración de Pb en la planta completa (Cp), los tratamientos fertilizados con NO_3 ($\text{nM}+\text{Pb}+\text{NO}_3^-$, $\text{M}+\text{Pb}+\text{NO}_3^-$) presentaron una mayor concentración que los fertilizados con NH_4 ($\text{nM}+\text{Pb}+\text{NH}_4^+$, $\text{M}+\text{Pb}+\text{NH}_4^+$), **Figura 18**. Esto posiblemente a que el medio formado con esta fuente de Nitrógeno facilita más la solubilidad del metal, lo que ayuda a que este más biodisponible para ser tomado por las raíces de las plantas.

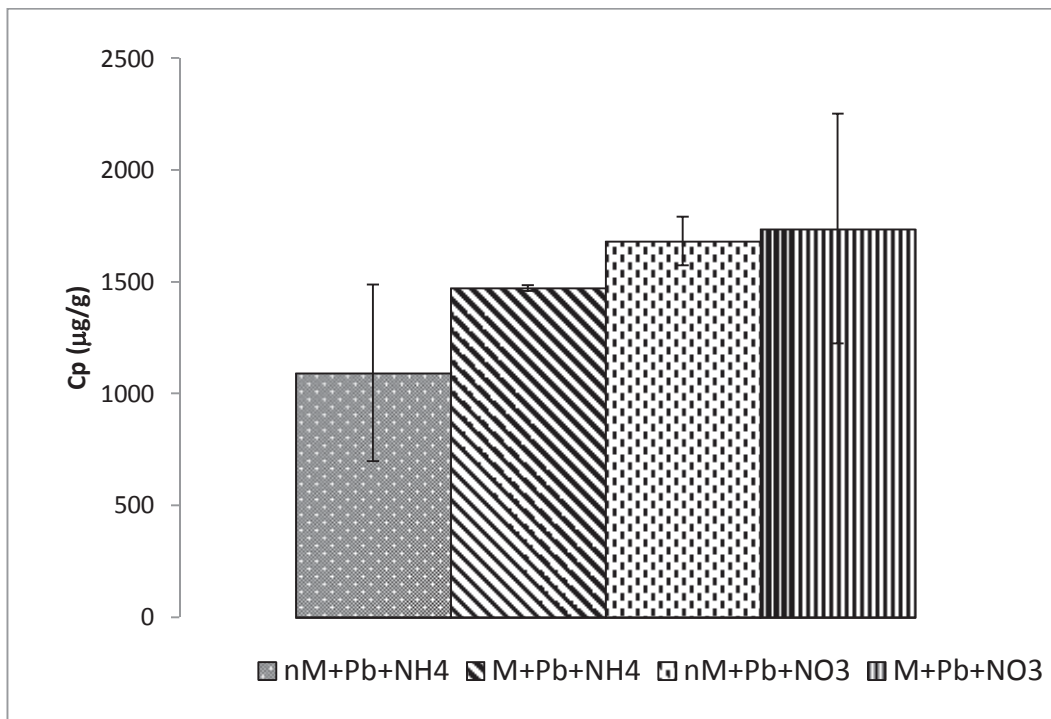


Figura 18. Concentración de Pb en planta entera, Cp de plantas de *Tagetes erecta*, fertilizadas con NH_4 y NO_3 inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices*, crecidas en macetas de 50g, con un número de réplicas (N)=5.

El factor de translocación del metal (TF) es una relación entre el C_{pPR} y C_{pPA} , la cual indica la capacidad que presenta la planta para transportar el metal absorbido de las raíces hacia la parte aérea. Los valores del TF calculados para Pb en *T. erecta* en este experimento fueron mucho menores a 1, lo que nos indica la poca capacidad de la planta de transportar el Pb hacia la PA, esto debido a que el Pb no es un metal que tiene una función fisiológica en las plantas por lo cual carecen de transportadores específicos para ello. Además de que no existe una diferencia marcada entre los diferentes tratamientos, es decir que el transporte no se ve afectado por las variables de micorrización y/o fuente de nitrógeno. **Figura 19.**

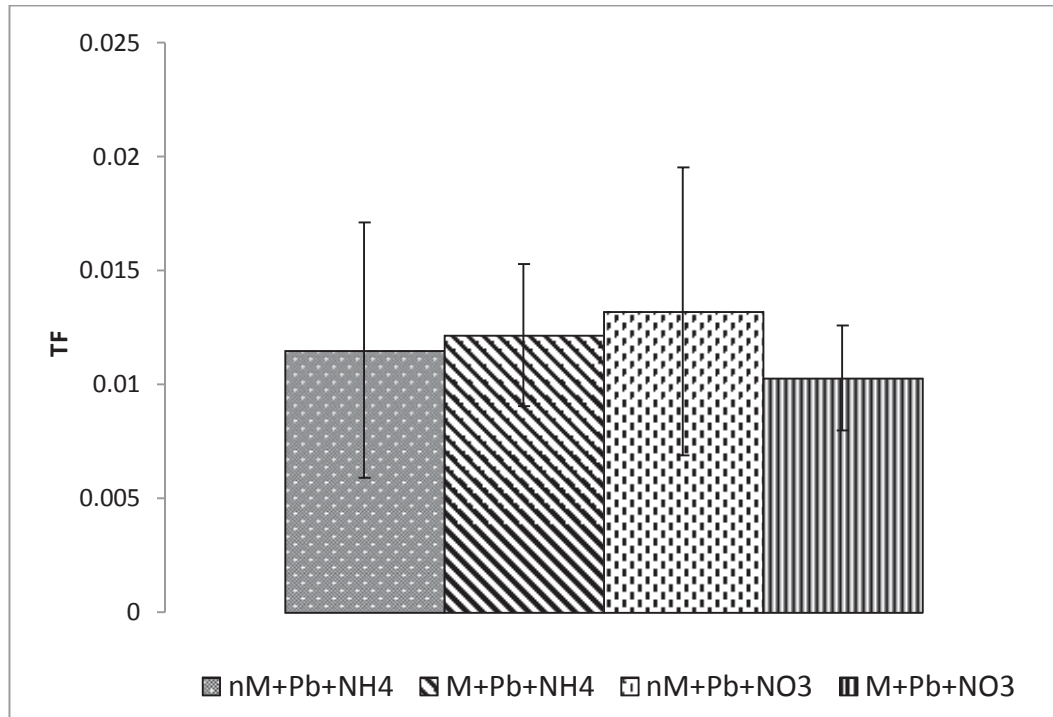


Figura 19. Factor de translocación (TF) para Pb de plantas de *Tagetes erecta*, fertilizadas con NH_4 y NO_3 inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices*, crecidas en macetas de 50g, con un número de réplicas (N)=5.

El Factor de Bioconcentración (BCF) es una relación que existe entre la concentración de metal en la planta completa (C_p) entre la concentración de metal en el suelo (C_s). Donde observamos que los tratamientos micorrizados ($M+Pb+NO_3^-$, $M+Pb+NH_4^+$) presentan un mayor BCF comparado con las plantas no micorrizadas ($nM+Pb+NO_3^-$, $nM+Pb+NH_4^+$), esto debido a que las plantas micorrizadas tienen un mayor C_{pPR} . Los tratamientos fertilizados con NO_3 ($nM+Pb+NO_3^-$, $M+Pb+NO_3^-$) presentan una mayor eficiencia de extracción comparado con los tratamientos con NH_4 ($nM+Pb+NH_4^+$, $M+Pb+NH_4^+$). **Figura 20.**

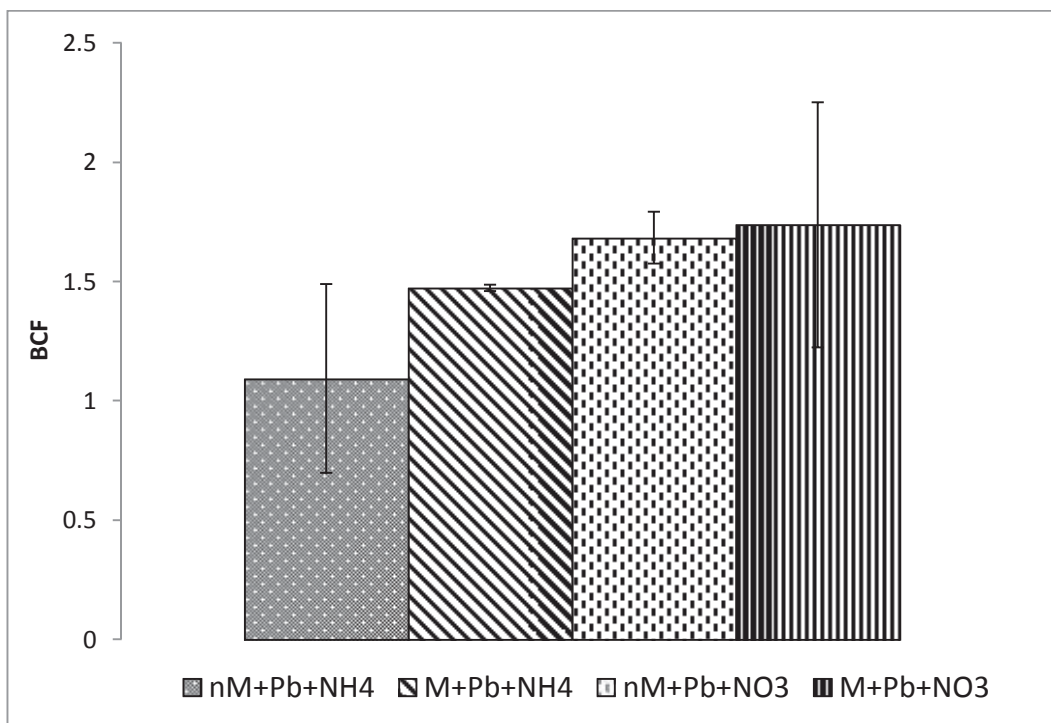


Figura 20. Factor de Bioconcentración (BCF) de plantas de *Tagetes erecta*, fertilizadas con NH_4 y NO_3 inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices*, crecidas en macetas de 50g, para una concentración de Pb en el sustrato (C_s) de 1000 mg Pb/ kg de sustrato seco, con una N=5.

La biomasa de las plantas completas (B_p) es representado por el peso seco de la planta. El análisis de los pesos secos se llevó a cabo por partes, de los cuales la biomasa seca de la parte aérea (B_{PA}) muestra un aumento significativo en las plantas micorrizadas en ausencia de Pb (M-Pb+NH₄) comparadas con los demás tratamientos fertilizados con NH₄. Para las plantas fertilizadas con NO₃, encontramos una disminución significativa en el peso de todos los tratamientos comparados con los controles (nM-Pb+NO₃), además, el tratamiento micorrizado y con Pb (M+Pb+NO₃) presenta el menor peso, esto debido a la toxicidad del Pb ya que estas plantas fueron las que presentaron el mayor Cp. **Figura 21.**

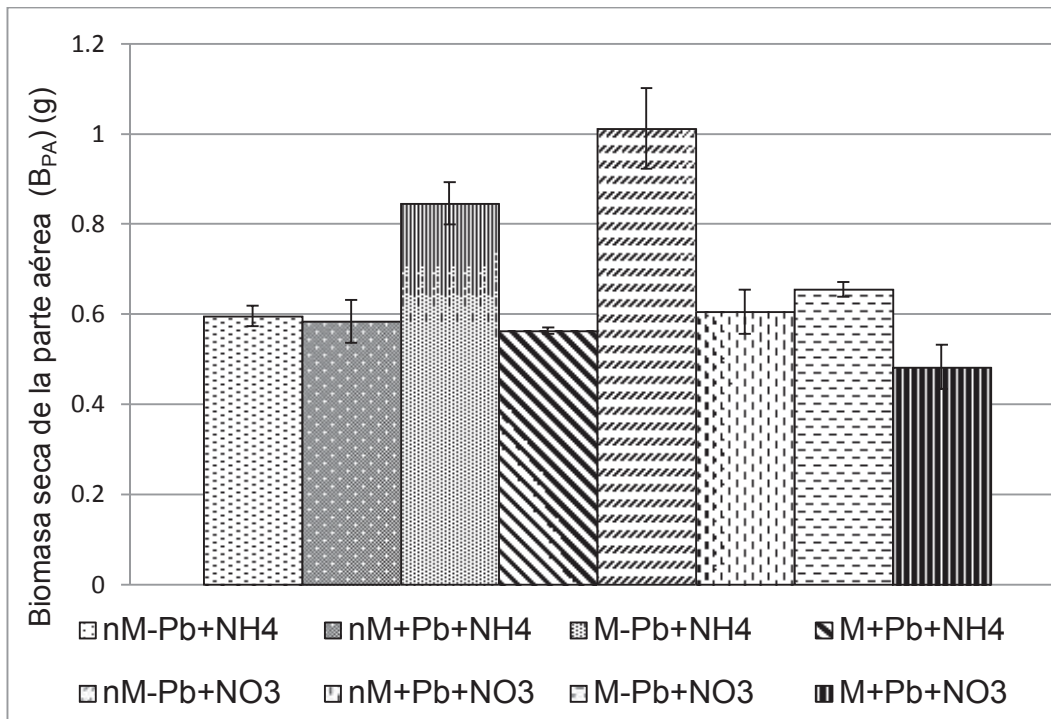


Figura 21. Peso seco de la parte aérea (PS_{PA}) de plantas de *Tagetes erecta*, fertilizadas con NH₄ y NO₃ inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices*, crecidas en macetas de 50g, con una N=5.

El peso seco de la parte raíz de las plantas (PS_{PR}) mostró un comportamiento parecido al del PS_{PA} , de las plantas fertilizadas con NO_3 , ya que en las plantas micorrizadas y con Pb, presentan un decremento de peso para ambas fuentes de nitrógeno, ($M+Pb+NH_4$, $M+Pb+NO_3$). **Figura 22.** Esta disminución se relaciona con el aumento de CP_{PR} de estos tratamientos.

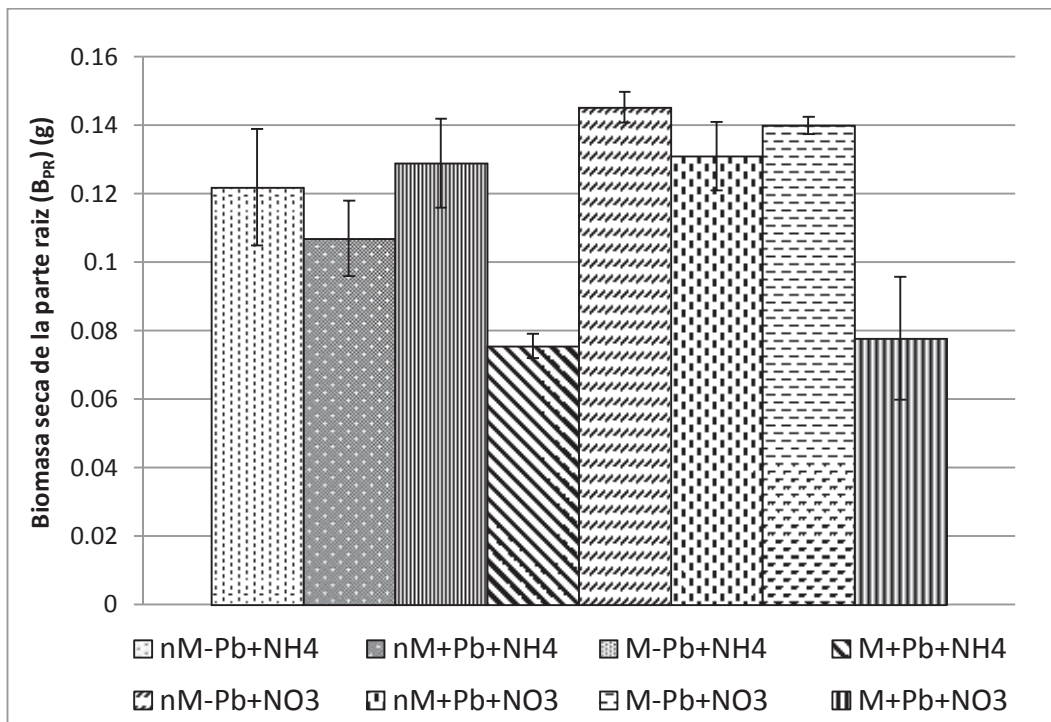


Figura 22. Biomasa seca de la parte raíz (B_{PR}) de plantas de *Tagetes erecta*, fertilizadas con NH_4 y NO_3 inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices*, crecidas en macetas de 50g, con una $N=5$.

Al analizar la biomasa seca de la planta completa Bp podemos ver que para los tratamientos fertilizados con NH_4 , no encontramos diferencias significativas entre las plantas nM-Pb+ NH_4 , nM+Pb+ NH_4 y M+Pb+ NH_4 , lo que nos indica que no se ven tan fuertemente afectadas en su desarrollo por la presencia del Pb. Además, las plantas micorrizadas y sin plomo (M-Pb+ NH_4) son las que tienen una mayor biomasa, esto debido a los aportes del HMA a estas. En los tratamientos fertilizados con NO_3 , las plantas control (nM-Pb+ NO_3) son las que presentan una mayor biomasa lo que nos indica que para esta fuente de nitrógeno el aporte del HMA no es tan marcado, sin embargo no encontramos diferencia entre los demás tratamientos. **Figura 23.**

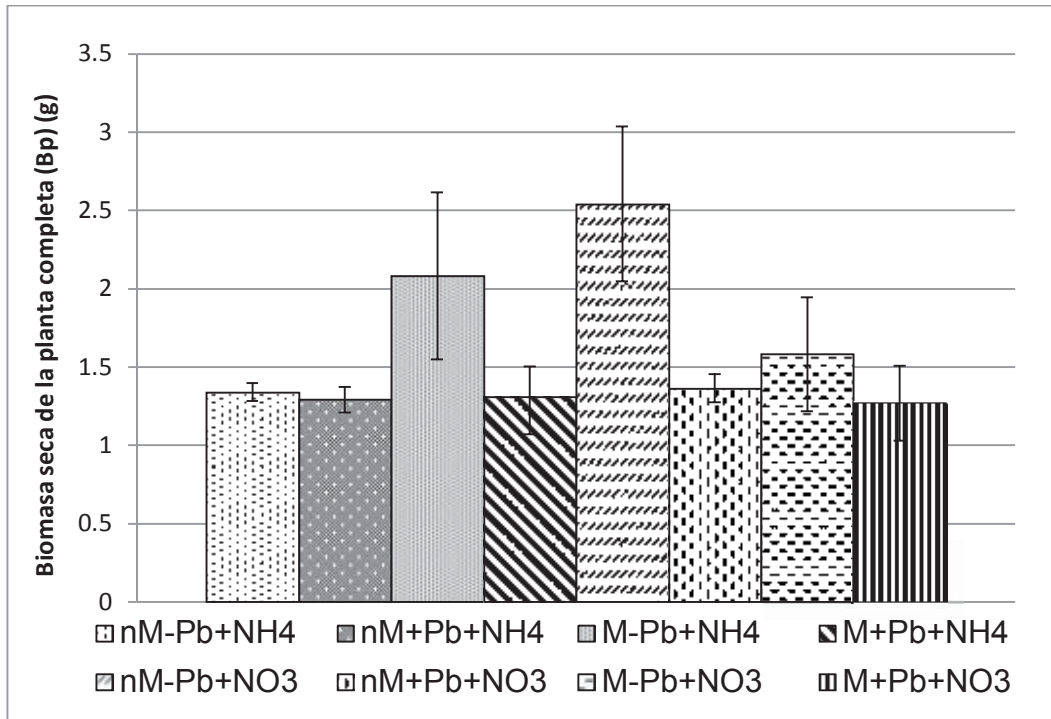


Figura 23. Biomasa seca de la planta (Bp) de plantas de *Tagetes erecta*, fertilizadas con NH_4 y NO_3 inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices*, crecidas en macetas de 50g, con una N=5.

Como era de esperarse, conociendo la toxicidad del Pb en las plantas, en el experimento se pudo observar que existió una disminución en el área foliar de las plantas (AF) debido a la presencia del Pb en los tratamientos. Además, que, las plantas fertilizadas con NH_4 sin plomo tienen un área foliar casi igual a la de sus controles, es decir, que, no presenta diferencia a la presencia de la micorriza, caso contrario para las plantas con NO_3 donde si se observa una disminución al estar micorrizadas, esto debido a que el hongo le demanda carbón a la planta para crecer, sin embargo esta parece mostrar una menor disminución cuando está presente el Pb, lo que indicaría una posible función de protección del hongo hacia la planta por el estrés de la presencia del Pb, **Figura 24**.

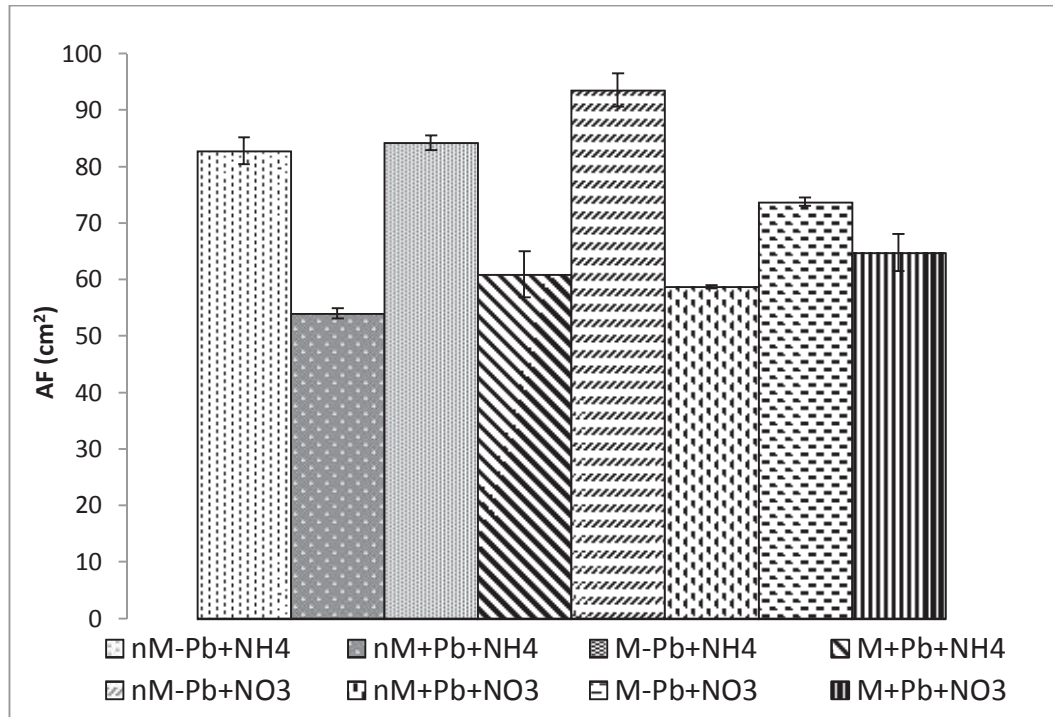


Figura 24. Área Foliar AF(cm²) de plantas de *Tagetes erecta*, fertilizadas con NH_4 y NO_3 inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices*, crecidas en macetas de 50g, con una N=5.

El análisis de la concentración de Pb soluble presente en las muestras de lixiviados, no presentó ninguna diferencia significativa entre los tratamientos nM+Pb+NH₄, M+Pb+NH₄ y nM+Pb+NO₃. Sin embargo, existe un ligero aumento de concentración en el tratamiento M+Pb+NO₃, lo indica una mayor solubilización del metal, ya que este se encuentra en mayor cantidad libre, lo que concuerda con los resultados de Cp y Mp obtenidos, **Figura 25**.

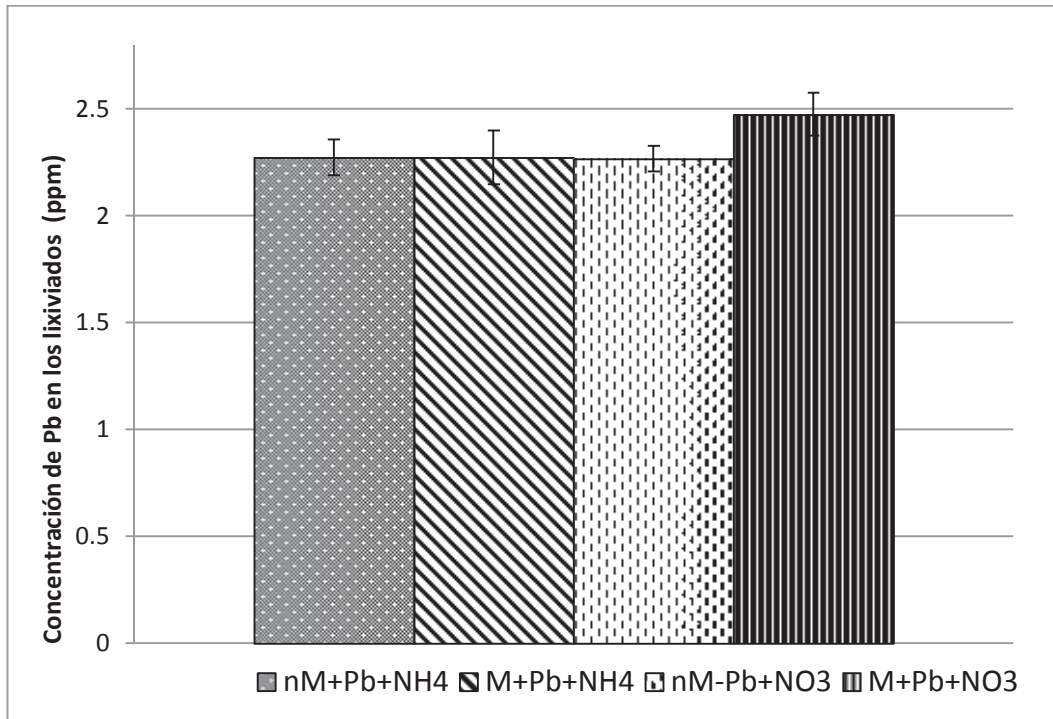


Figura 25. Concentración de Pb en los lixiviados de plantas de *Tagetes erecta*, fertilizadas con NH₄ y NO₃ inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices*, crecidas en macetas de 50g, con una N=5.

El pH que se monitoreó durante el experimento mantuvo un comportamiento estable, mostrando un aumento de la alcalinidad para los casos en donde se tenía la interacción hongo-Pb para ambas fuentes de nitrógeno (NH_4 , NO_3), esto debido probablemente a la solubilización del Pb, ya que en los demás casos se mantiene casi constante y uniendo estos resultados con el análisis de las concentraciones de Pb, es factible pensar que el proceso de solubilización del Pb, que está influenciado por el pH está directamente relacionado con dicho cambio, ya que las plantas de tratamiento M+Pb+ NO_3 son las que presentan mayor Cp y es donde tenemos mayor pH, **Figura 26.**

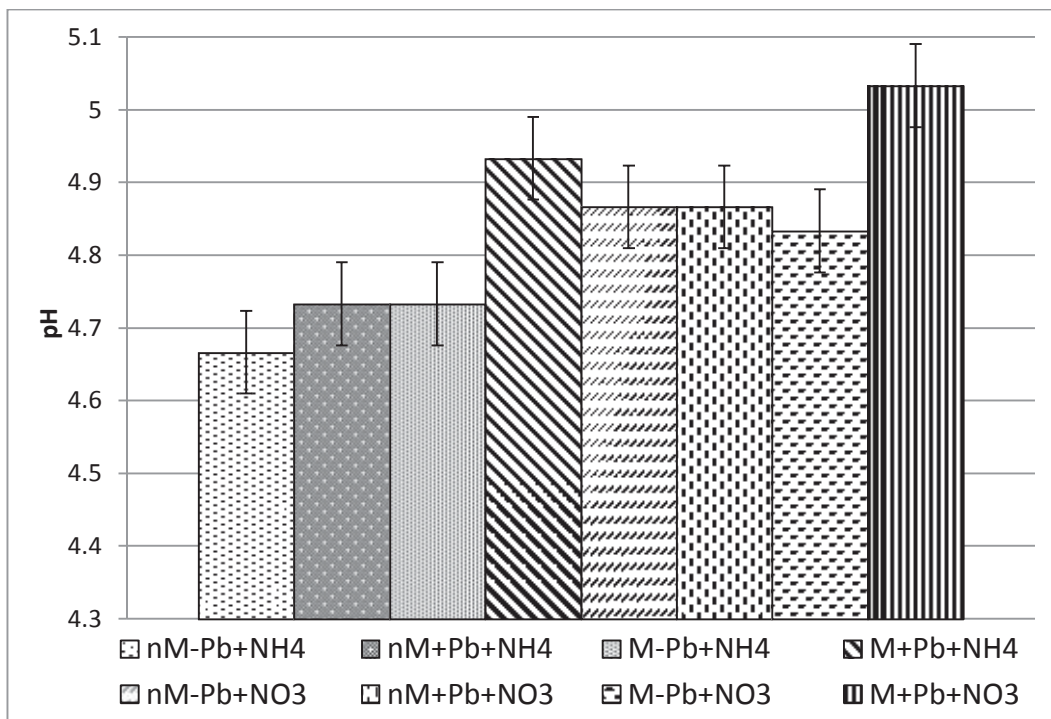


Figura 26. El pH acumulativo durante el experimento de plantas de *Tagetes erecta*, fertilizadas con NH_4 y NO_3 inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices*, crecidas en macetas de 50g, con una N=5.

Finalmente se calculó la cantidad de metal extraído (Mp) el cual es resultado de la multiplicación del Cp por la biomasa de la planta (Bp) y este nos representa los μg de Pb extraídos por la planta, lo que se puede entender como una eficiencia de fitorremediación. Las plantas de los tratamientos fertilizados con NO_3 presentaron un mayor Mp comparadas con las fertilizadas con NH_4 . Además que las plantas del tratamiento M+Pb+ NO_3 presentan el mayor Mp de todos los tratamientos, es decir que con fines de fitorremediación son los que presentan una mayor eficiencia. **Figura 27.**

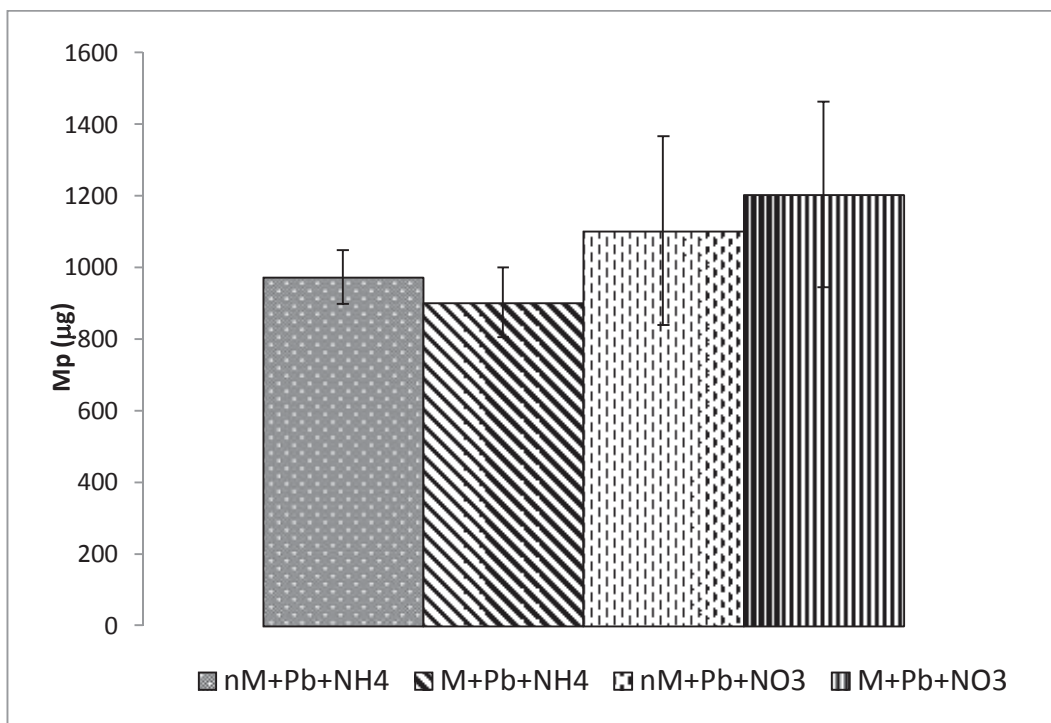


Figura 27. Cantidad de metal extraído Mp (μg) de plantas de *Tagetes erecta*, fertilizadas con NH_4 y NO_3 inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices*, crecidas en macetas de 50g, con una N=5.

En resumen, todos los tratamientos mostraron resistencia al estrés por plomo, lo cual nos indica una buena tolerancia de la planta *T. erecta* a concentraciones elevadas (como lo es 1000 ppm). Así como también del hongo MA *G. intrarradices*, ya que a pesar de que la presencia del plomo su porcentaje de colonización es bueno.

Las plantas micorrizadas y fertilizadas con NO_3 presentan mayores valores de Cp, BCF y Mp así como de pH y concentración de Pb en lixiviados lo cual nos lleva a concluir que es el mejor tratamiento con fines de fitorremediación. Por lo cual para el siguiente experimento solo utilizaremos esta fuente de nitrógeno.

3.3 AUMENTO DEL ÁREA DE CRECIMIENTO.

Durante la etapa de crecimiento las condiciones ambientales se mantuvieron aproximadamente constantes, teniendo una humedad relativa de $70.98 \pm 6.49\%$ y una temperatura de 23.38 ± 0.5 °C. Además de tener un fotoperiodo de 16hrs con una intensidad de luz de 4400 ± 570 lúmenes.

Las plantas crecidas en macetas de 50g, presentaron un buen desarrollo y se mostraron saludables hasta que fueron cosechadas, sin embargo, se apreció que las plantas nM+Pb(2) empezaban a presentar hojas secas en la parte inferior, además de presentar un menor tamaño comparadas con las que no contenían Pb nM-Pb(1). Las plantas micorrizadas sin Pb (M-Pb(3)) presentaron un mayor tamaño comparadas con las M+Pb(4), pero a pesar de esto siguen estando saludables. **Figura 28.**

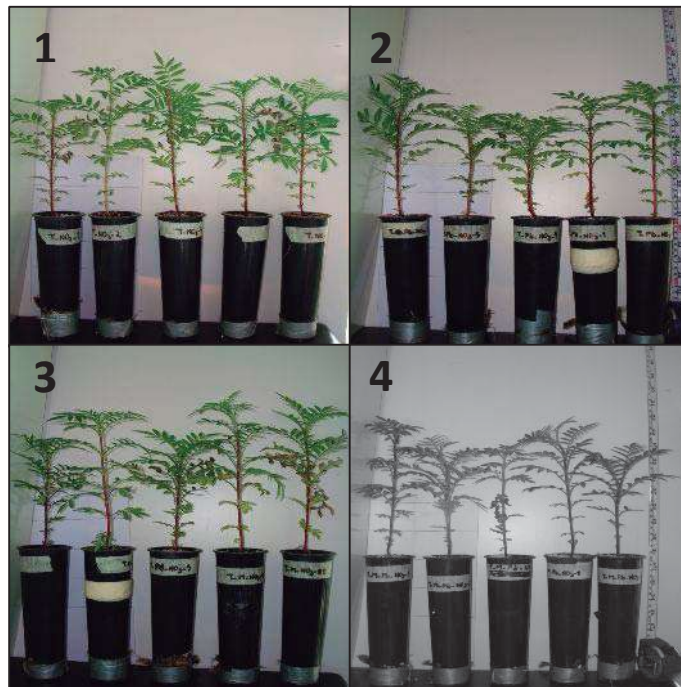


Figura 28. Imágenes de plantas de *Tagetes erecta* crecidas en macetas de 50g durante 9 semanas y fertilizadas con NO_3 inoculadas (3 y 4) y sin inocular (1 y 2) con *Glomus intrarradices* y con Pb (2 y 4) y sin Pb (1 y 3). 1) nM-Pb, 2) nM+Pb, 3) M-Pb y 4) M+Pb.

Las plantas crecidas en macetas de 135g, se desarrollaron bien y se mostraron saludables durante el periodo de crecimiento. Las plantas *nM+Pb*(2) no presentaron grandes diferencias con las plantas *nM-Pb*(1). Las plantas micorrizadas sin Pb (*M-Pb*(3)) presentaron un mayor tamaño comparadas con todos las plantas *M+Pb*(4). **Figura 29.**



Figura 29. Imágenes de plantas de *Tagetes erecta* crecidas en macetas de 135g durante 9 semanas y fertilizadas con NO_3 inoculadas (3 y 4) y sin inocular (1 y 2) con *Glomus intrarradices* y con Pb (2 y 4) y sin Pb (1 y 3). 1) *nM-Pb*, 2) *nM+Pb*, 3) *M-Pb* y 4) *M+Pb*.

Al comparar las plantas crecidas en macetas de 50g con las de 135g, vimos claramente que estas últimas tienen un mejor desarrollo en cuanto a tamaño, tenían tallos más gruesos y presentaron un mayor desarrollo radicular.

El análisis del volumen de raíz de los diferentes tratamientos en macetas de 50g, presentó una disminución en los tratamientos nM+Pb, M-Pb y M+Pb comparado con nM-Pb, lo que nos indica un efecto en el desarrollo por la presencia de la micorriza tanto como del Pb. En las plantas crecidas en 135g, se observa un claro aporte de la micorriza en las plantas **M+Pb** las cuales tienen un mayor volumen que las controles **nM-Pb**. En cuanto a las plantas nM y M en presencia de Pb, presentan disminución significativa en su volumen radical.

Figura 30.

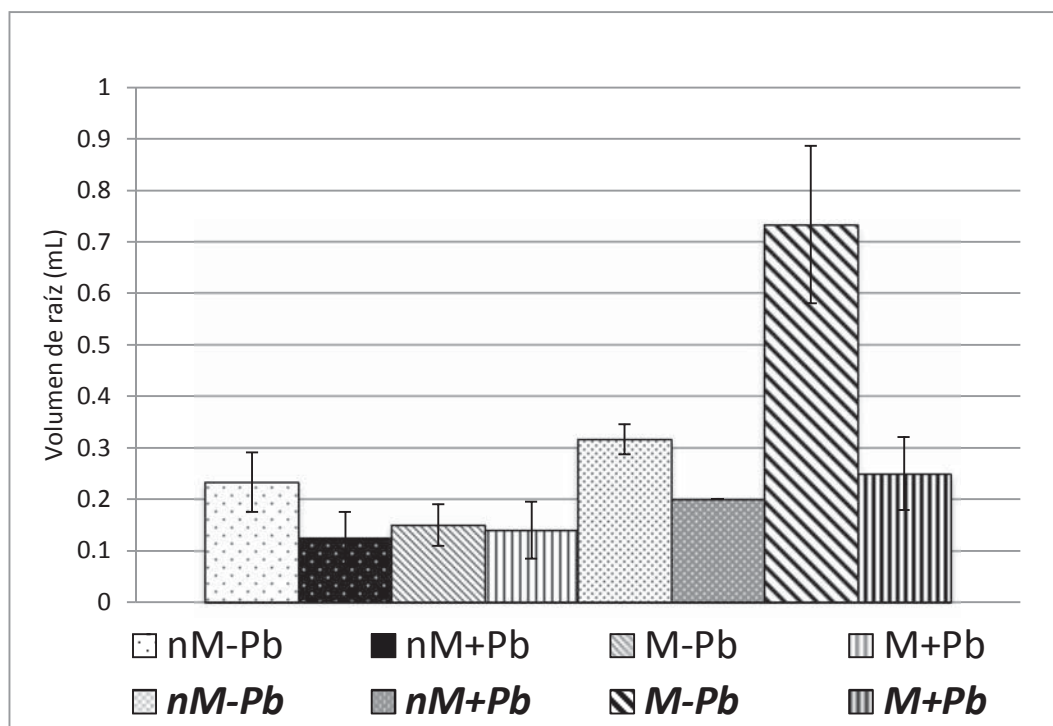


Figura 30. Volumen de raíz de plantas de *Tagetes erecta* inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices* crecidas en macetas de 50g (nM-Pb, nM+Pb, M-Pb, M+Pb) y en 135g (**nM-Pb**, **nM+Pb**, **M-Pb**, **M+Pb**), con un número de réplicas, N = 3.

La longitud de las raíces en las plantas crecidas en las macetas de 50g, muostro un incremento en las plantas M+Pb comparadas con las nM-Pb del 36.89%. Para las plantas crecidas en macetas de 135g, se observó que las plantas **nM-Pb** presentan una mayor longitud radicular comparada con las **nM+Pb**, sin embargo, cuando las plantas se encuentran micorrizadas **M-Pb** y **M+Pb** se presentó un aumento en su longitud, el cual se ve disminuido por la presencia de Pb para todos los tratamientos, **Figura 31**.

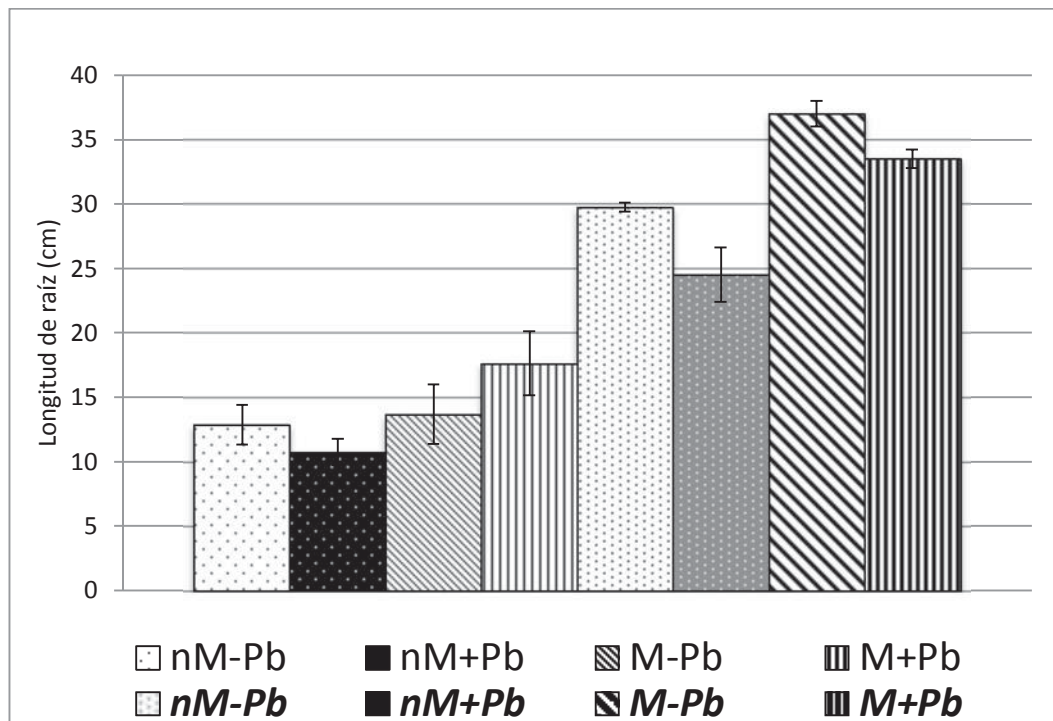


Figura 31. Longitud de la raíz de plantas de *Tagetes erecta* inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices* crecidas en macetas de 50g (nM-Pb, nM+Pb, M-Pb, M+Pb) y en 135g (**nM-Pb**, **nM+Pb**, **M-Pb**, **M+Pb**), con un numero de réplicas, N = 3.

La evaluación del porcentaje de micorrización por tinción de las raíces y el análisis al microscopio de las mismas, mostro que, existió una buena colonización. Por otro lado, existió un aumento en el número de vesículas a la presencia del Pb, esto puede indicar efectos de estrés del hongo por presencia del Pb, **Figura 32 y 33.**

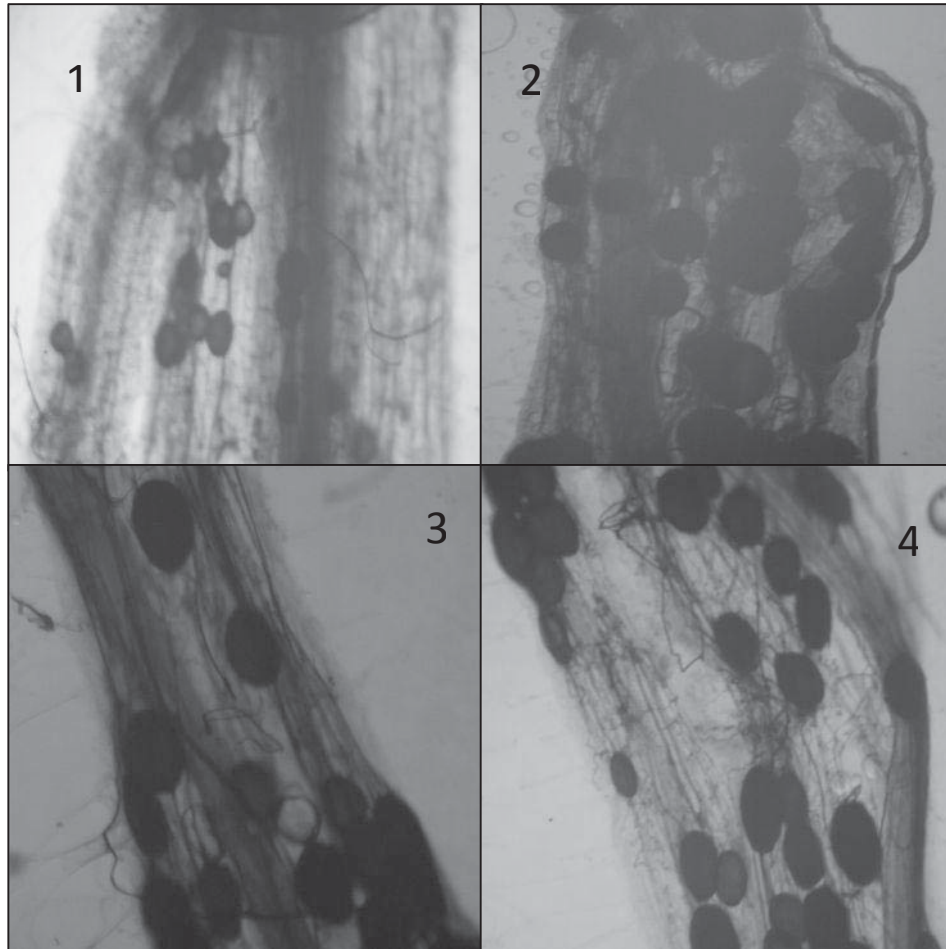


Figura 32. Micrografías de raíces teñidas de plantas de *Tagetes erecta* inoculadas (M) con el HMA *Glomus intrarradices* crecidas en macetas de 50g (M-Pb (1), M+Pb(2)) y en 135g (**M-Pb(3)**, **M+Pb(4)**), con un numero de réplicas, N = 3.

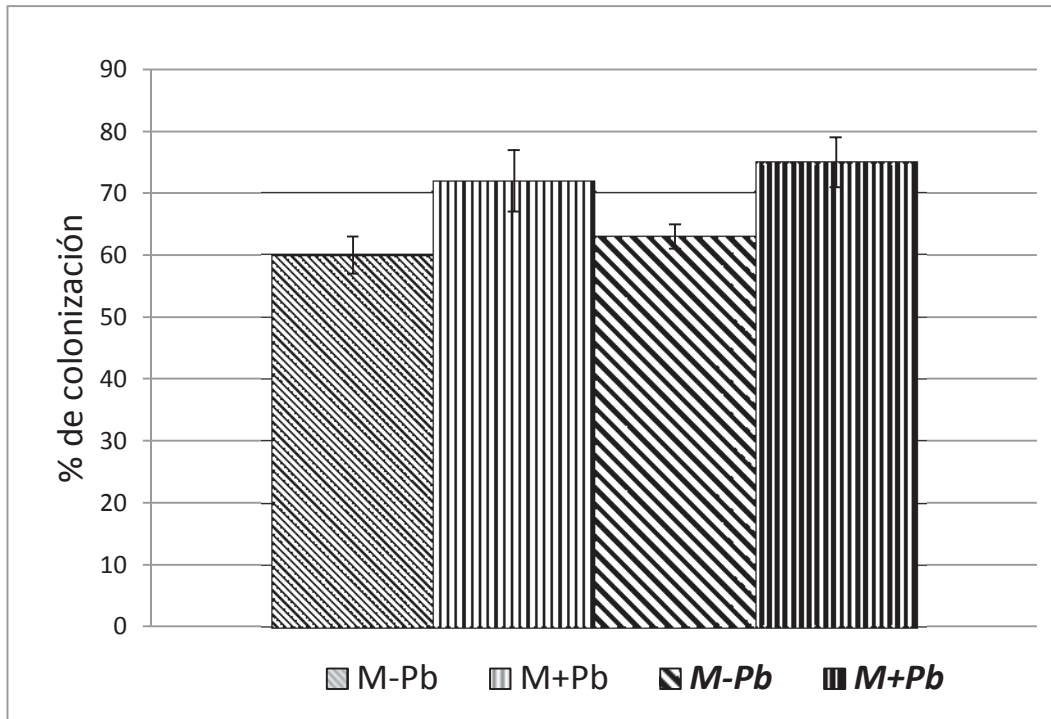


Figura 33. Porcentaje de colonización de raíces teñidas de plantas de *Tagetes erecta* inoculadas (M) con el HMA *Glomus intraradices* crecidas en macetas de 50g (M-Pb, M+Pb) y en 135g (**M-Pb**, **M+Pb**), con un número de réplicas, N = 3.

El análisis de las muestras de tejido de planta crecidas en macetas de 50g y en 135g para cuantificar la cantidad de Pb extraído (M_p), se realizó primero midiendo la concentración de Pb en las partes aéreas y raíces (C_{pPA} y C_{pPR}) para después calcular la concentración en la planta entera (C_p).

El C_{pPA} de las plantas crecidas en 50g $M+Pb$ presenta un ligero incremento comparado con las plantas $nM+Pb$, el cual está pequeño apenas del 5.5% que no se puede decir que exista un aporte por parte del hongo para dicho comportamiento. Mientras que en las plantas crecidas en 135g, las plantas **$nM+Pb$** tienen hasta un 22.7% más C_{pPA} que las **$M+Pb$** . El efecto del aumento de sustrato sobre C_{pPA} es claramente beneficioso logrando un aumento del 146.16% para las plantas nM y del 90% para las M , siendo las $nM+Pb$ las que presentan la mayor concentración de $79.61\mu g$ por g de materia seca de parte aérea. **Figura 34.**

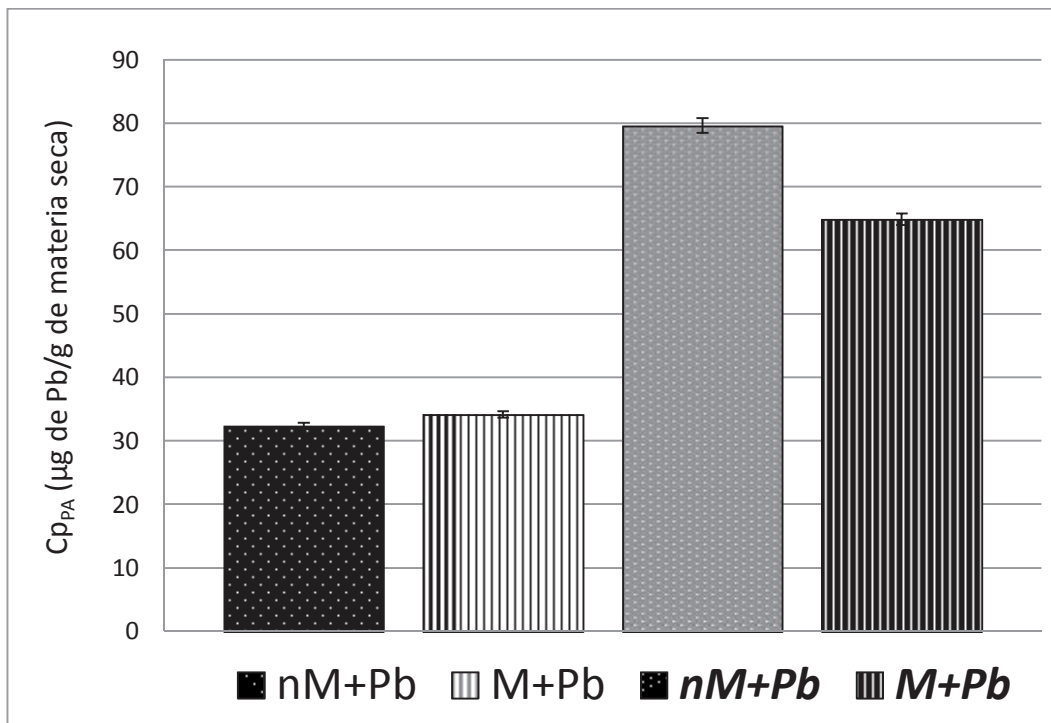


Figura 34. Concentración de Pb en parte aérea, C_{pPA} de plantas de *Tagetes erecta* inoculadas y sin inocular (M , nM) con el HMA *Glomus intrarradices*, crecidas en macetas de 50g ($nM+Pb$, $M+Pb$) y en 135g (**$nM+Pb$** , **$M+Pb$**), cada barra representa la mezcla de 3 plantas de cada tratamiento.

En las macetas de 50g el CP_{PR} , encontramos que las plantas $nM+Pb$ presentan una mayor concentración que las plantas $M+Pb$, dicho incremento representa un 29.31% más de Pb por g de materia seca. Y en las macetas de 135g, el aumento fue del 14.2% entre las $nM+Pb$ y $M+Pb$. La comparación entre los tamaños de maceta muestra un incremento para las plantas crecidas en las macetas de 135g, del 77.33% para las $nM+Pb$ y del 100.79% en las $M+Pb$. Siendo las $nM+Pb$ las de mayor concentración con 1552.19 μ g por g de materia seca de raíz. **Figura 35.**

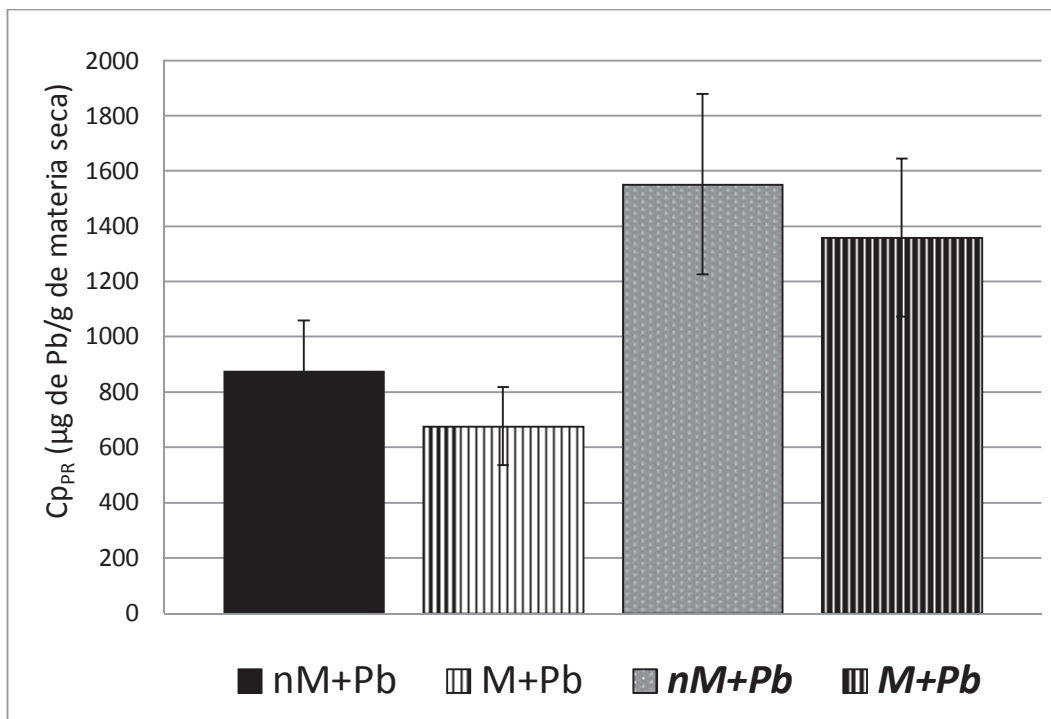


Figura 35. Concentración de Pb en parte raíz, Cp_{PR} de plantas de *Tagetes erecta* inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices* crecidas en macetas de 50g ($nM+Pb$, $M+Pb$) y en 135g ($nM+Pb$, $M+Pb$), cada barra representa la mezcla de 3 plantas de cada tratamiento.

La concentración de Pb en la planta completa, $C_{p_{total}}$ calculada con los $C_{p_{PA}}$ y $C_{p_{PR}}$, para las plantas crecidas en 50g, encontramos que las plantas nM+Pb presentan un 41.066% de Pb más que las plantas M+Pb. Para las plantas crecidas en 135g, el incremento de concentración de las plantas **nM+Pb** es apenas del 6.69% comparado con las **M+Pb**. La comparación entre los tamaños de maceta muestra un claro aumento en la las macetas de 135g y la disminución de la diferencia entre los tratamientos nM y M para estas, el cual es más marcado en las de 50g. **Figura 36.**

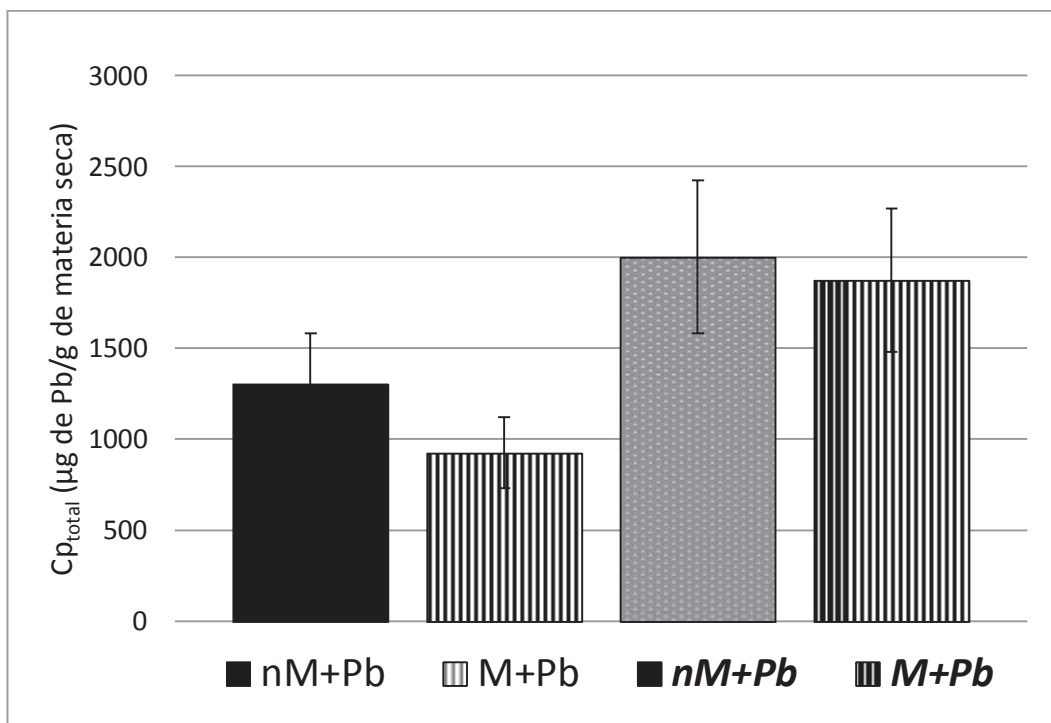


Figura 36. Concentración de Pb en plantas entera $C_{p_{total}}$ de plantas de *Tagetes erecta* inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices* crecidas en macetas de 50g (nM+Pb, M+Pb) y en 135g (**nM+Pb**, **M+Pb**), cada barra representa la mezcla de 3 plantas de cada tratamiento.

El factor de translocación indica la capacidad que presenta la planta para poder transportar el Pb de las raíces a la parte aérea, para el caso de las plantas crecidas en macetas de 50g, las plantas M+Pb, tienen un TF mayor en 36.44% con respecto a las plantas nM+Pb, para las plantas crecidas en 135g, encontramos un comportamiento diferente, ya que las plantas **M+Pb** tiene un TF un poco menor a las **nM+Pb**. Al hacer la comparación entre los dos sistemas, se puede ver como las plantas M+Pb, **nM+Pb** y **M+Pb**, tiene un TF aproximadamente igual. Pero aun así en ambos casos el valor de factor es muy pequeño como para ser considerado como posibilidad de fitoextracción. **Figura 37.**

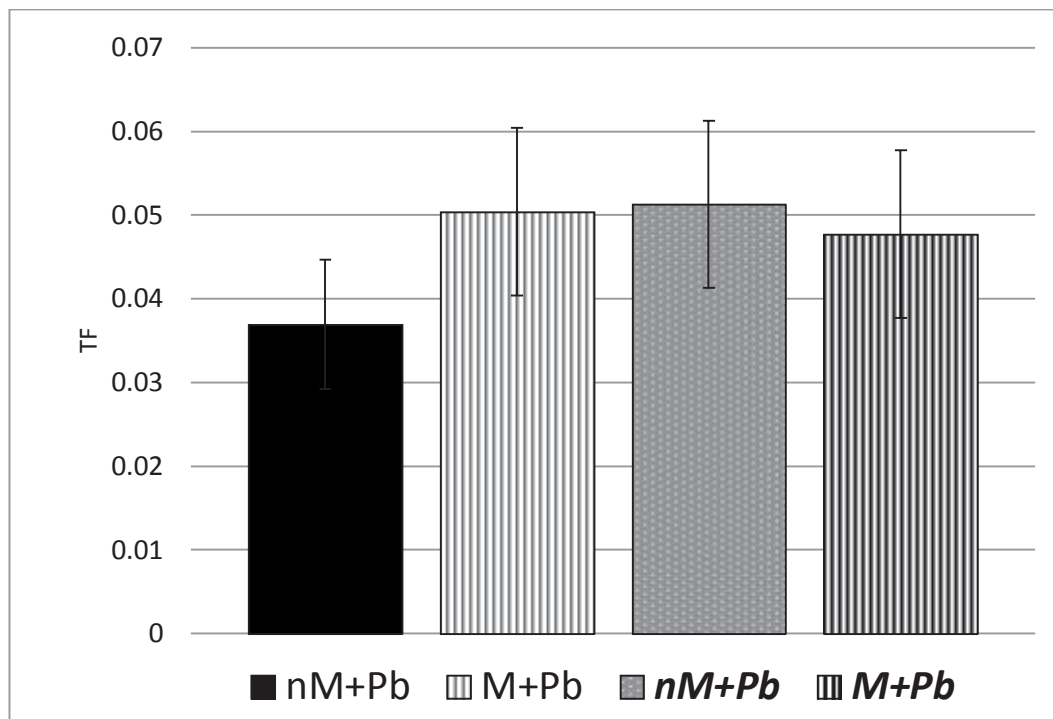


Figura 37. El factor de translocación TF de plantas de *Tagetes erecta* inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices* crecidas en macetas de 50g (nM+Pb, M+Pb) y en 135g (**nM+Pb**, **M+Pb**), cada barra representa la mezcla de 3 plantas de cada tratamiento.

El factor de bioconcentración BCF de las plantas crecidas *nM+Pb* fue 41.06% mayor que el de las *M+Pb*. Para las plantas crecidas en 135g encontramos un aumento comparando con las de 50gr, y una pequeña disminución entre las plantas *nM+Pb* y *M+P*. Lo que nos indica una mayor capacidad de capturar metal del suelo cuando las plantas crecen en un volumen mayor de sustrato. **Figura 38.**

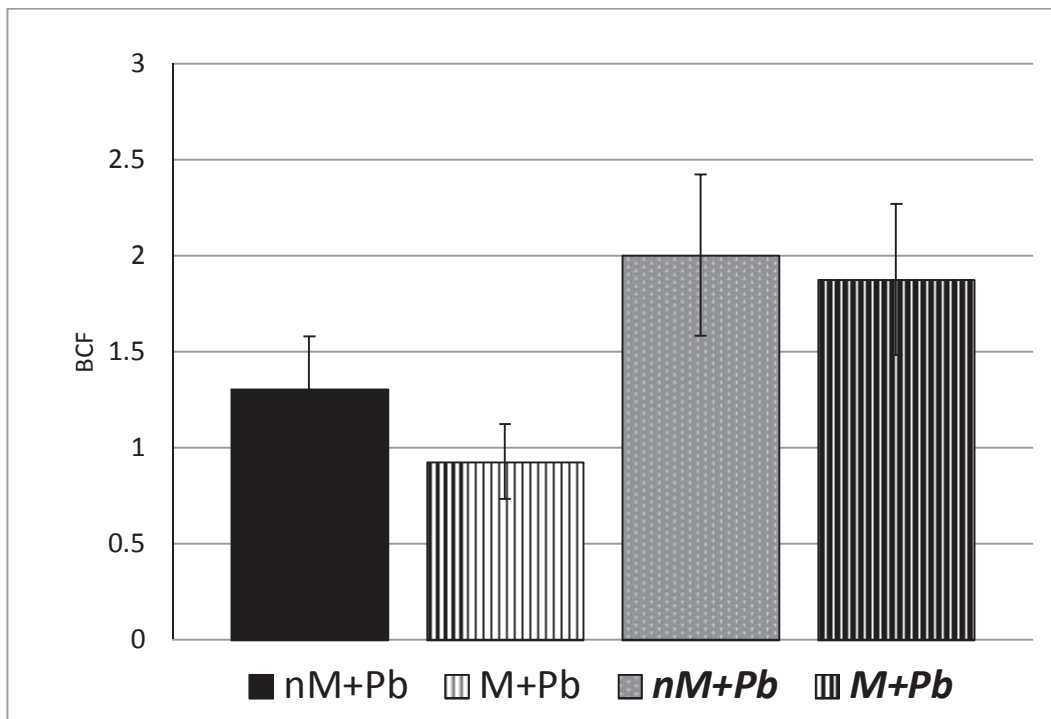


Figura 38. EL factor de bioconcentraci3n BCF de plantas de *Tagetes erecta* inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices* crecidas en macetas de 50g (*nM+Pb*, *M+Pb*) y en 135g (*nM+Pb*, *M+Pb*), cada barra representa la mezcla de 3 plantas de cada tratamiento.

La comparación de la biomasa seca de la parte aérea B_{PA} de las plantas crecidas en macetas de 50g y las de 135g, muestra un mayor crecimiento en las plantas **M-Pb** que los demás tratamientos de ambos sistemas. Además de un incremento del 68.25% con las plantas M-Pb, lo que indica claramente que al aumento de área de crecimiento las micorrizas se desarrollan mejor y aportan mayores beneficios a las plantas. Por otro lado para el sistema de 50g vemos que existe una clara disminución en las plantas nM+Pb comparadas con las nM-Pb, esto debido a la toxicidad del Pb. pero para el caso de las plantas micorizadas esta disminución no es significativa. Caso contrario a las plantas del sistema de 135g, las cuales por tener un mejor espacio de desarrollo las diferencias por la toxicidad por el Pb son más marcadas. **Figura 39.**

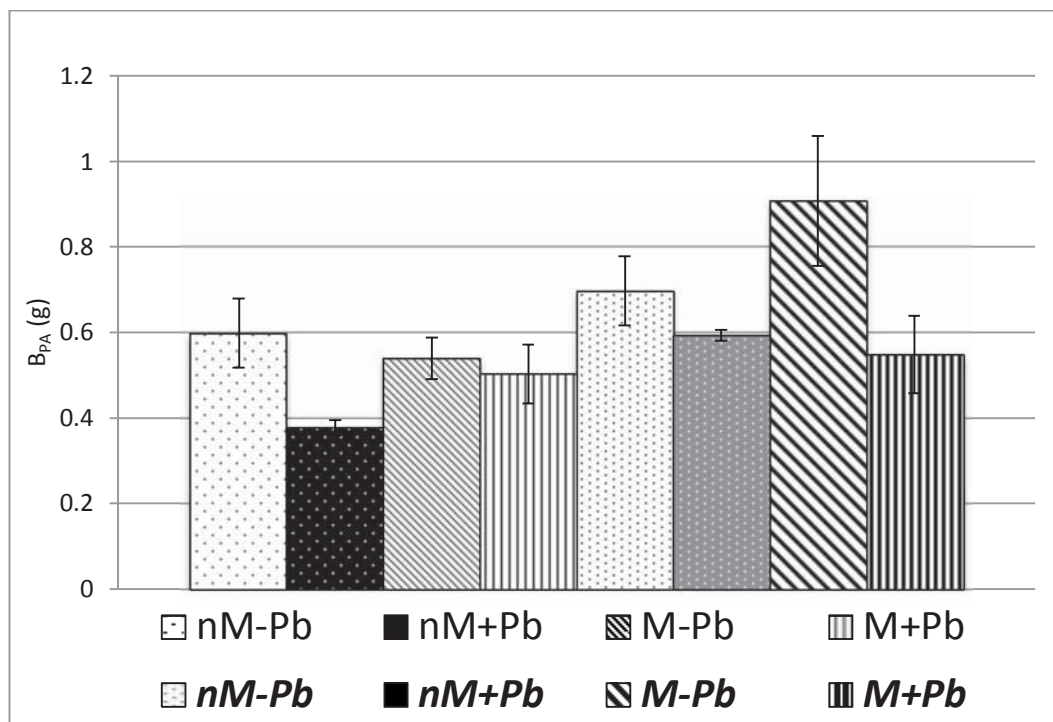


Figura 39. Biomasa seca de la parte aérea B_{PA} de plantas de *Tagetes erecta* inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices* crecidas en macetas de 50g (nM-Pb, nM+Pb, M-Pb, M+Pb) y en 135g (**nM-Pb**, **nM+Pb**, **M-Pb**, **M+Pb**), con un número de réplicas, N = 3.

En cuanto al B_{PR} de las plantas crecidas en macetas de 50g, encontramos una disminución en los tratamientos nM+Pb, M-Pb y M+Pb comparado con nM-Pb, y en las plantas crecidas en 135g podemos observar como la mayor cantidad de sustrato ayuda a un mejor desarrollo del sistema radicular de la plantas, comparadas con las de 50g, además de un claro efecto de disminución por la presencia de Pb. **Figura 40.**

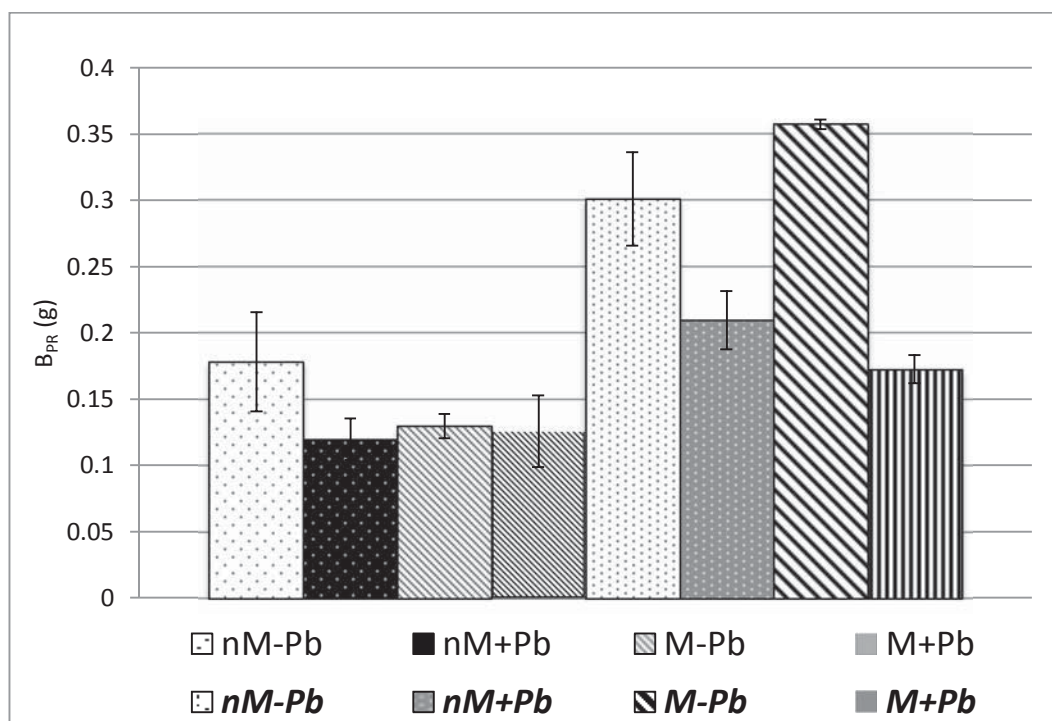


Figura 40. Biomasa seca de las raíces B_{PR} de plantas de plantas de *Tagetes erecta* inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices* crecidas en macetas de 50g (nM-Pb, nM+Pb, M-Pb, M+Pb) y en 135g (**nM-Pb**, **nM+Pb**, **M-Pb**, **M+Pb**), con un numero de réplicas, N = 3.

En cuanto la Bp para las plantas crecidas en 50g, las plantas nM presentan una disminución en su biomasa hasta de 35.95% en presencia de Pb (nM+Pb), mientras que en las plantas M, no encontramos diferencia. Las plantas crecidas en 135g muestran un mejor desarrollo que las macetas con 50g. La disminución por la toxicidad del Pb es más evidente en este sistema, pero aun así, se logra un crecimiento igual o mayor que en el sistema de 50g. **Figura 41.**

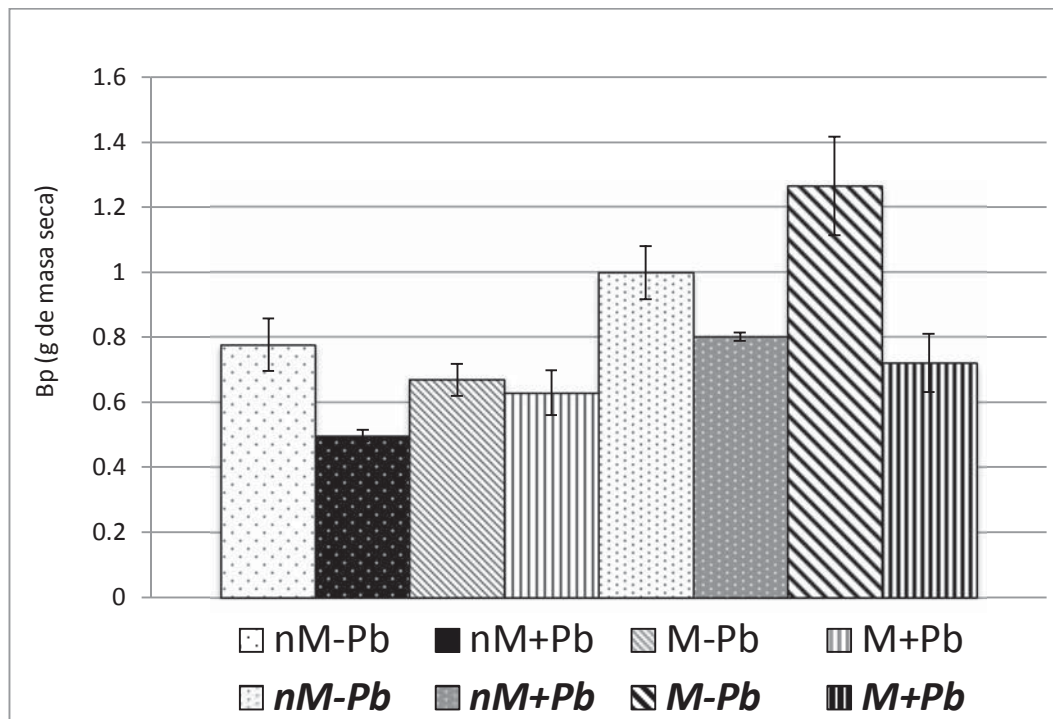


Figura 41. Biomasa de la planta Bp de plantas de *Tagetes erecta* inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices* crecidas en macetas de 50g (nM-Pb, nM+Pb, M-Pb, M+Pb) y en 135g (*nM-Pb*, *nM+Pb*, *M-Pb*, *M+Pb*), con un número de réplicas, N = 3.

El área foliar presenta un comportamiento muy interesante, mientras que en las plantas crecidas en macetas de 50g, se aprecia una disminución del 28% de los tratamientos nM+Pb, M-Pb y M+Pb, comparados con las nM-Pb. En las plantas crecidas en macetas de 135g, la disminución del AF entre las plantas **nM-Pb** y las **nM+Pb** es del 62% y con las plantas **M-Pb** y **M+Pb** es de 50%, entre estas últimas no existe diferencia, lo que indica que la micorriza ayuda a aminorar la disminución. **Figura 42.**

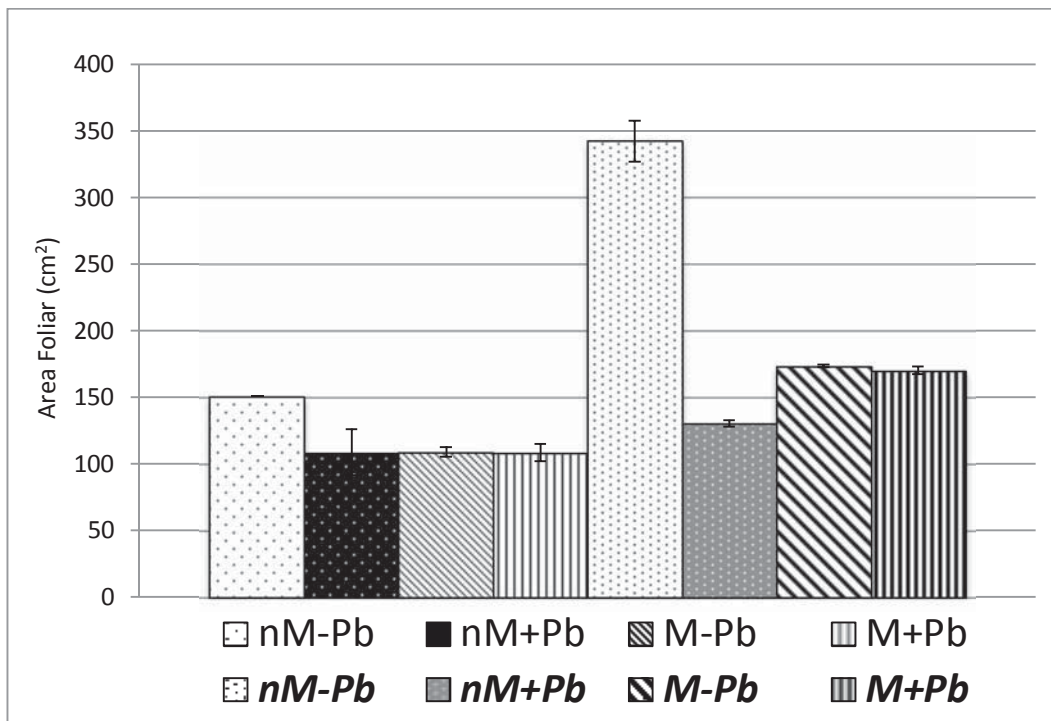


Figura 42. El área foliar AF (cm²) de plantas de *Tagetes erecta* inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices* crecidas en macetas de 50g (nM-Pb, nM+Pb, M-Pb, M+Pb) y en 135g (**nM-Pb**, **nM+Pb**, **M-Pb**, **M+Pb**), con un número de réplicas, N =

3.

La concentración de Pb en los lixiviados de las plantas nos muestra la concentración de Pb soluble que se pierde por riego durante el experimento. Para el sistema de 50g, encontramos una concentración mayor para las planas M+Pb que en las nM+Pb. para el caso de las macetas de 135g, tenemos exactamente lo contrario siendo la concentración **M+Pb** la más pequeña de todos los tratamientos en ambos sistemas, lo cual puede explicar porque el valor de Mp fue menor para este tratamiento ya que pudo existir menos Pb soluble en el sistema. **Figura 43.**

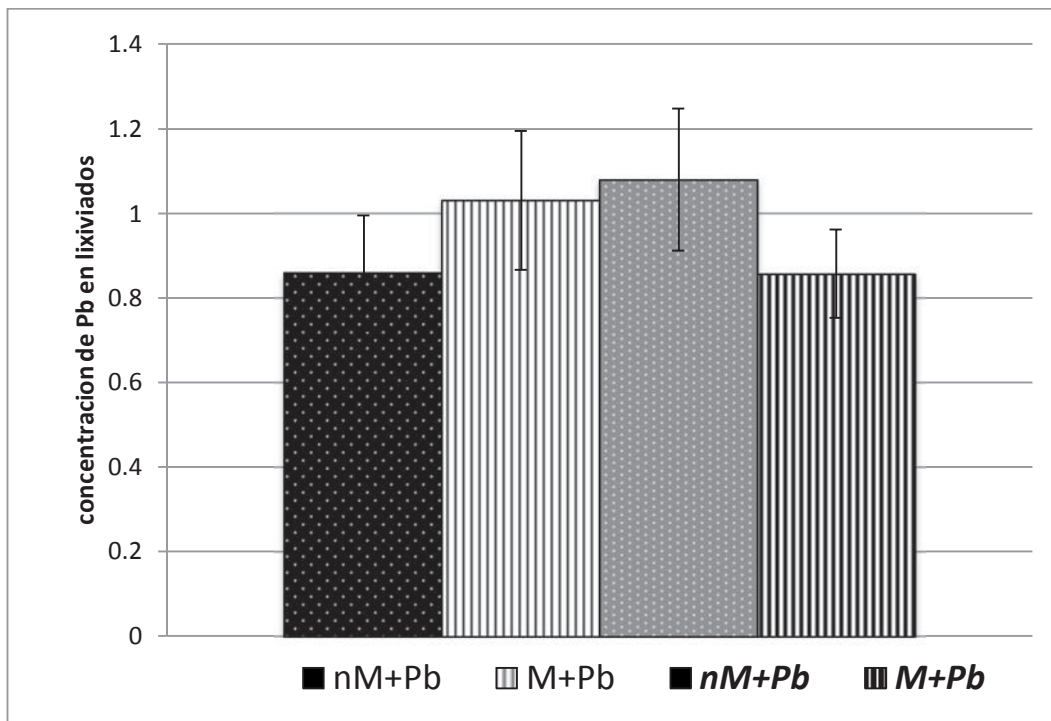


Figura 43. Concentración de Pb en los lixiviados de riego de plantas de *Tagetes erecta* inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices* crecidas en macetas de 50g (nM+Pb, M+Pb) y en 135g (**nM+Pb**, **M+Pb**), con un número de réplicas, N = 3.

El pH acumulativo durante el crecimiento de las plantas se mantuvo prácticamente constante. El comportamiento para ambos sistemas fue prácticamente igual, encontrando un aumento en el pH para todos los tratamientos que contienen Pb (nM+Pb, M+Pb, **nM+Pb** y **M+Pb**). **Figura 44.**

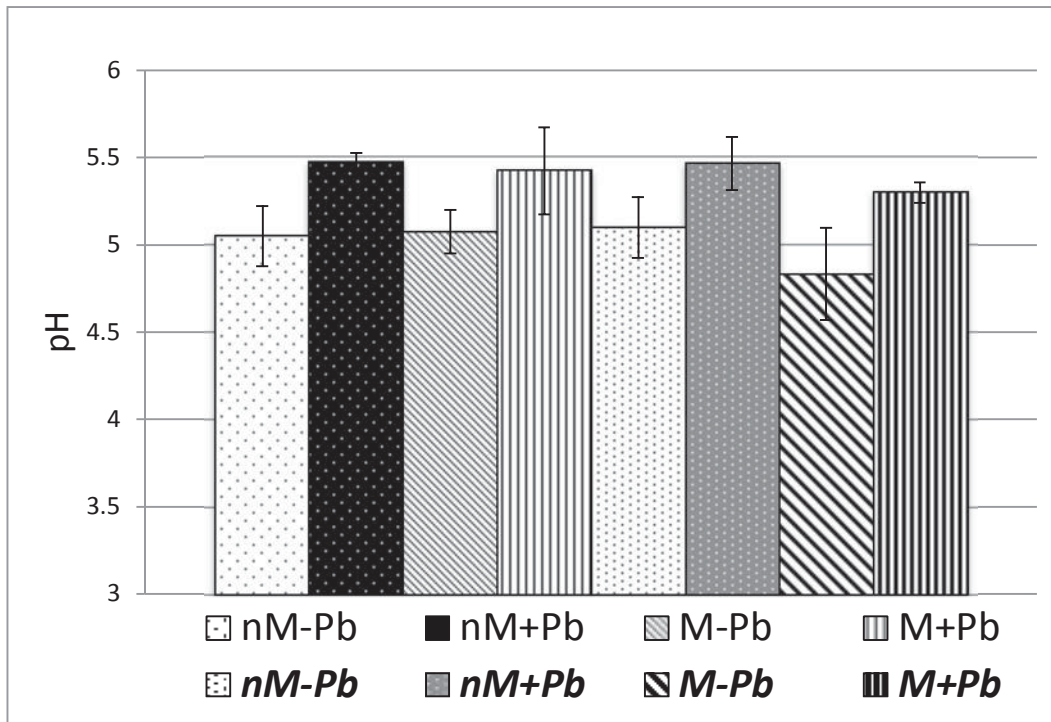


Figura 44. El pH acumulativo durante el crecimiento de plantas de *Tagetes erecta* inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices* crecidas en macetas de 50g (nM-Pb, nM+Pb, M-Pb, M+Pb) y en 135g (**nM-Pb**, **nM+Pb**, **M-Pb**, **M+Pb**), con un número de réplicas, N = 3.

El análisis de la concentración de Pb en la solución surfactante proveniente del lavado de las raíces de las plantas crecidas en macetas de 50g, nos muestra la concentración de Pb desorbida. Se puede ver que la concentración de Pb es mayor para las plantas *nM+Pb*. **Figura 45.**

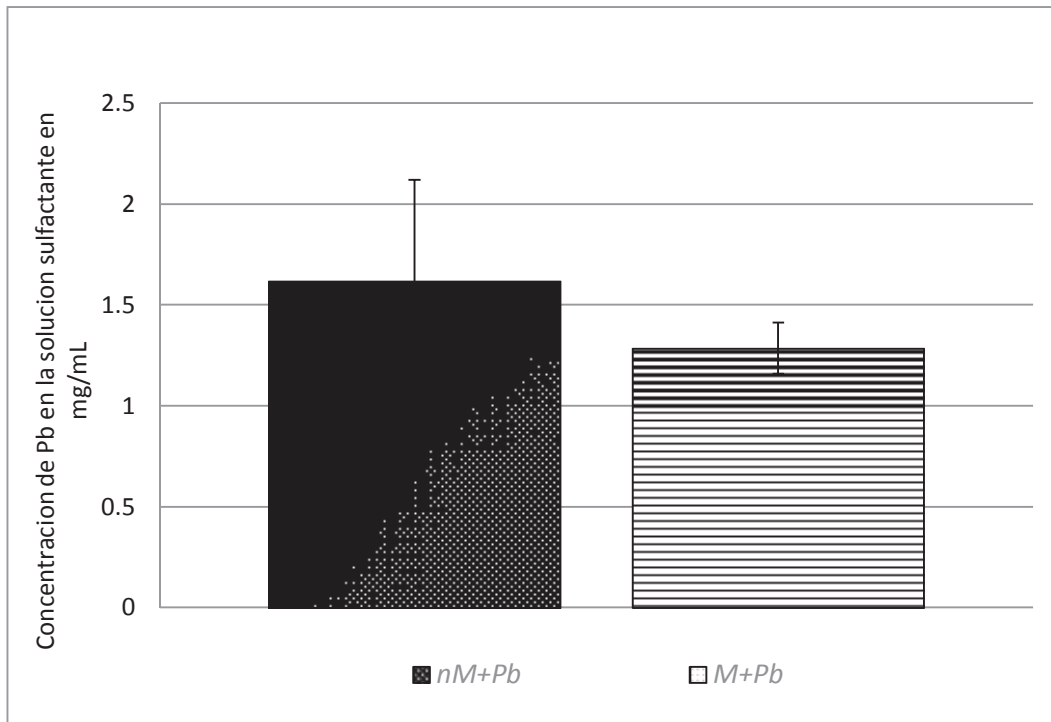


Figura 45. Concentración de Pb en la solución surfactante utilizada para el lavado de raíces de plantas de *Tagetes erecta* inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices* crecidas en macetas de 50g (nM+Pb, M+Pb), N = 3.

La comparación del C_{pPR} de las plantas crecidas en macetas de 50g, sin tratar y tratadas con una solución surfactante (ver capítulo 2c), nos ayuda a cuantificar la cantidad de metal absorbido y el adsorbido en las raíces. En las plantas nM encontramos que la concentración de las plantas sin tratar ($nM+Pb$) es 72.12% mayor que en las tratadas ($nM-Pb$) y en las plantas M es un 28.54% mayor en las sin tratar ($M+Pb$) que las tratadas ($M+Pb$). Lo que nos indica que las plantas M presentan mayor cantidad metal absorbido, es decir, una afinidad 2.53 mayor que las plantas nM. **Figura 46.**

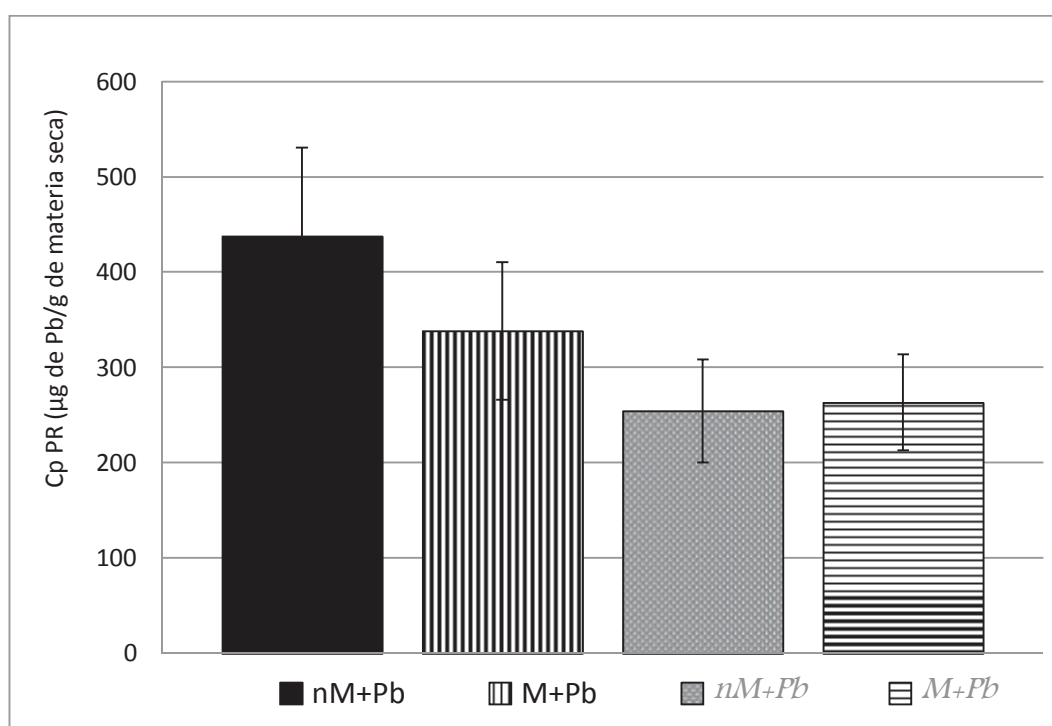


Figura 46. Concentración de Pb en las raíces C_{pPR} de plantas de *Tagetes erecta* inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices* crecidas en macetas de 50g, tratadas ($nM+Pb$, $M+Pb$) y sin tratar ($nM+Pb$, $M+Pb$) con solución surfactante, cada barra representa la mezcla de 3 plantas de cada tratamiento.

La cantidad de metal extraído (Mp) en las macetas de 50g fue un 33.0% mayor en las plantas nM+Pb que en las plantas M+Pb, sin embargo, hubo un gran aumento de este cuando las plantas crecieron en macetas de 135g, casi del 100% para ambos casos, siendo las plantas **nM+Pb** las que removieron una mayor cantidad de Pb alcanzando los 1860 μ g de Pb. **Figura 47.**

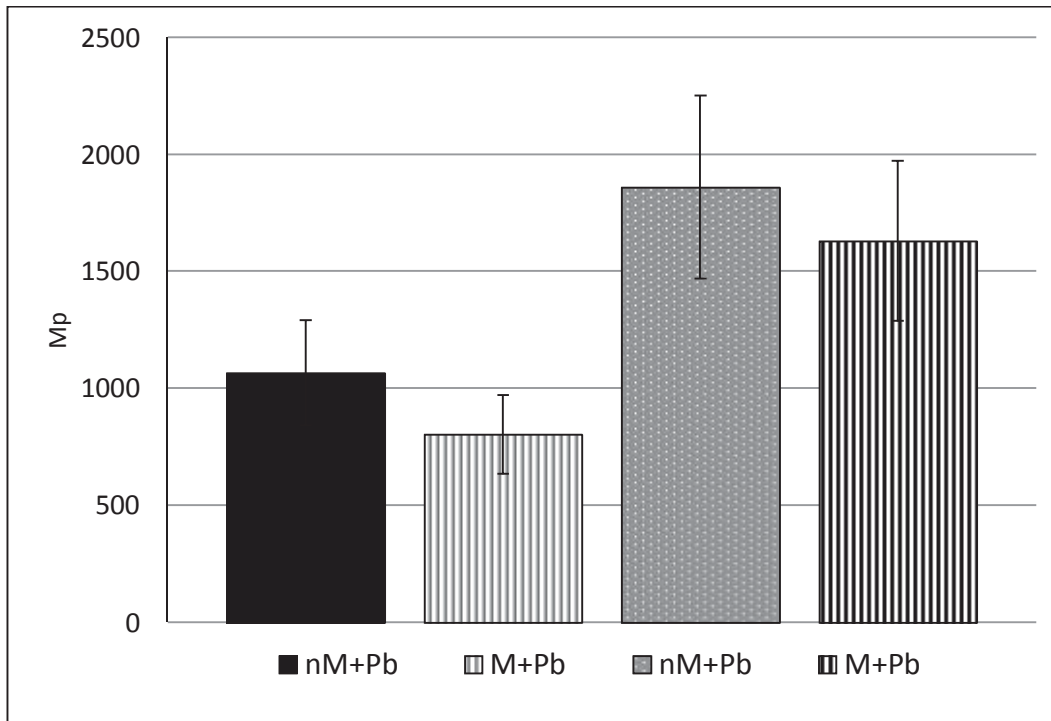


Figura 47. Mp en μ g de Pb por plantas de *Tagetes erecta* inoculadas y sin inocular (M, nM) con el HMA *Glomus intrarradices* crecidas en macetas de 50g (nM-Pb, nM+Pb, M-Pb, M+Pb) y en 135g (**nM-Pb, nM+Pb, M-Pb, M+Pb**), con un numero de réplicas, N = 3.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1 IN VITRO

El porcentaje de colonización en las raíces aumentó del 48% (tratamiento sin plomo) al 62% cuando se trataron con plomo. El porcentaje de estructuras tales como vesículas y micelio también aumentó en las raíces micorrizadas tratadas con Pb. No así el porcentaje de arbusculos el cual mostro una reducción.

La aplicación de Pb afectó el número de esporas total producido por *G. intraradices* en el medio de cultivo, disminuyéndolas en un 14%. El tamaño de las esporas, también fue influenciada por la aplicación de Pb. En contraste con el número de esporas, el área de las esporas aumento con el tratamiento con Pb de $4480 \mu\text{m}^2\text{esporas}^{-1}$ en el tratamiento sin Pb a $7000 \mu\text{m}^2\text{esporas}^{-1}$ en el tratamiento con Pb.

El aumento de la micorrización se ha observado en suelos contaminados por metales pesados (Wong et al., 2007) y se interpreta como la tolerancia del hongo a metales pesados (Arriagada et al., 2005). El aumento del número y del área de las vesículas, así como del micelio podría interpretarse como mecanismo de protección y/o de supervivencia del hongo dentro de la raíz.

El mecanismo de protección de las esporas contra los metales pesados no ha sido suficientemente aclarado. Sin embargo, el aumento del área de las esporas parece tener relación con la retención del Pb. Los HMA tolerantes a metales pesados tienen una alta afinidad por los metales pesados (Joner et al., 2000).

En presencia de $\text{Pb}^{2+}(\text{aq})$, las esporas y las vesículas responden aumentando su tamaño, cambiando de color a amarillo-rojo (esporas) o su forma (vesículas). Esto nos lleva a la hipótesis de que una importante concentración de Pb se haya acumulado dentro de las esporas y dentro de raíces colonizadas.

Además, es bien sabido que el cambio de color es una de las manifestaciones del cambio de composición química (Bartrecki et al., 2000). Las esporas adquieren un color rojo amarillento cuando se expone al $Pb^{2+}(aq)$. Este color es característico de la $Pb(II)-O$ (Gardner, 2005) y trabajos previos reportan la unión de $Pb(II)$ a los grupos carboxilo del ácido galactónico entre otros compuestos de la pared celular de las plantas (Sharma y Dubey, 2005), por lo cual el Pb podría ser sustancialmente fijado en las paredes celulares de la espora. González-Guerrero et al (2008) observaron un cambio de color de las esporas de *G. intraradices* a un azul-verdoso cuando se expone a los iones de cobre ($Cu^{2+}(aq)$) en el medio de cultivo *in vitro*. Se correlaciona esto a la alta acumulación de Cu en las esporas.

El aumento del porcentaje de colonización muestra la capacidad de los hongos micorrícicos para crecer en suelos contaminados con Pb . El sistema de micorrizas en medio contaminado con Pb mostró altas concentraciones de Fe y Pb en las raíces y una alta concentración de Pb en las esporas y micelio. Las altas concentraciones de Fe en el sistema *D. carota-G. intraradices* en condiciones de estrés por Pb , indica una relación sinérgica entre el HMA y el huésped, y una posible mayor tolerancia al Pb por el hongo a través de una mayor absorción de Fe . Por lo tanto, el efecto protector de los HMA frente a la toxicidad de metales pesados en las raíces parece estar basado en el número y tamaño de las estructuras del hongo con actividad metabólica reducida, como las vesículas.

4.2 FUENTES DE NITROGENO

A pesar que las plantas fertilizadas con NH_4 crecieron bien y no presentaron grandes síntomas de toxicidad por la presencia de Pb, las plantas fertilizadas con NO_3 se muestran más sanas, lo que puede indicar que estas lograron tener una mayor resistencia o tolerancia al Pb.

La aparición de hojas secas en las plantas pudo deberse a los síntomas de estrés, posiblemente indica que existió un transporte de Pb hacia las partes aéreas y esto empezó a interferir en las funciones fisiológicas de la planta, como la producción de clorofila entre otras. (Sharma y Dubey, 2005).

El análisis de la colonización en los tratamientos inoculados nos mostró un interesante aumento en cuanto al número de estructuras internas del hongo, como vesículas, cuando las plantas se encontraban en presencia de Pb, comportamiento similar ha sido visto para el caso de cobre en el mismo sistema simbiótico *Tagetes erecta-Glomus intrarradices* (Castillo *et al*; 2011), y además ya se ha reportado para otros metales en otras plantas y HMA. Los análisis realizados mostraron una posible relación entre la cantidad de metal absorbido y el aumento de las vesículas, una hipótesis al respecto puede ser que se trate de una respuesta natural a la toxicidad por parte del HMA y que una forma de respuesta al estrés sea generar mayor número de vesículas, las cuales son estructuras de reserva. Dicho aumento a su vez, ayuda a la acumulación de metales pesados ya que estos pueden quedar adheridos en las paredes de las vesículas, lo anterior recientemente reportado mediante un análisis con microscopio electrónico de transmisión (TEM) en raíces de *Z. mays* inoculadas con HMA (Zhang *et al* 2010).

Las plantas fertilizadas con NH_4 presentaron incrementos en las concentraciones de Pb tanto en las raíces (PR) y en las partes aéreas (PA) cuando las plantas se encontraban inoculadas con HMA *Glomus intrarradices*, lo

que indica que el hongo ayuda a acumular mayor cantidad de plomo a las plantas en sus diferentes partes. Por otro lado, las plantas fertilizadas con NO_3 no micorrizadas (nM) presentan un mayor Cp_{PA} comparado con las M, pero en las raíces se presenta un comportamiento contrario, es decir que las plantas fertilizadas con NO_3 y micorrizadas presentaron un mayor Cp_{PR} , teniendo un incremento en el Cp_{PR} del 26% comparado con las plantas nM. Esto nos indica que la inoculación con el HMA *Glomus intrarradices* ayuda al aumento de la acumulación de Pb en las partes de la planta para las dos fuentes de nitrógeno NH_4 y NO_3 , sin embargo, aunque las plantas micorrizadas y fertilizadas con NH_4 presentan aumentó en los Cp_{PR} y Cp_{PA} , comparando con los controles no micorrizados y mayor Cp_{PA} que las plantas micorrizadas y fertilizadas con NO_3 , las plantas del tratamiento M+Pb+ NO_3 son las que presentan el mayor Cp_{PR} y por consecuencia un mayor Cp en la planta entera, lo que indica que son las plantas que tienen mayor concentración de Pb en sus tejidos.

La capacidad que tenga o presente una planta para acumular los metales pesados en su parte aérea se mide o expresa mediante el factor de translocación (TF). Dicho factor es muy importante ya que este nos indica la capacidad que tiene una planta para ser utilizada en las subtecnologías de la fitorremediación utilizadas para el caso de suelos contaminados por metales pesados que son la Fitoextracción y la Fitoestabilización. Los resultados obtenidos nos indican que la plantas *Tagetes erecta* no son capaces de transportar y acumular el Pb en sus partes aéreas, ya que los valores de TF obtenidos son muy bajos ya que están por debajo de 1, esto independientemente de la fuente de nitrógeno utilizada o si están micorrizadas, por todo lo anterior, se puede ver que *Tagetes erecta* no sirve para ser utilizada como planta fitoextractora de Pb, sin embargo, los valores de Pb acumulados en sus raíces son buenos y nos indica que si puede servir como una planta fitoestabilizadora de Pb y cuando esta se encuentra micorrizada y fertilizada con NO_3 sus valores de Pb inmovilizado son mayores.

Una forma de medir el desarrollo de las plantas puede ser a través del área foliar, la cual, en todos los tratamientos que crecieron en presencia de Pb se

aprecia una reducción del área, lo cual, era de esperarse ya que el Pb no es un elemento esencial para el crecimiento de las plantas si no un elemento toxico que afecta el crecimiento. Sin embargo, las plantas micorrizadas muestran una menor disminución por la presencia del Pb comparadas las plantas no-micorrizadas, lo cual indica que la presencia del HMA ayuda a tolerar mejor el estrés por el Pb a las plantas, además, cuando se encuentran fertilizadas con NO_3 la disminución es mucho menor, es decir que las plantas se lograron seguir desarrollando a pesar de la toxicidad del Pb, lo cual es muy importante para los fines de la fitorremediación. Esto se puede relacionar con la cantidad de biomasa de las plantas Bp, donde vimos que de las plantas fertilizadas con NH_4 del tratamiento compuesto por plantas micorrizadas sin Pb, (M-Pb+ NH_4), fueron las que presentaron mayor biomasa esto por los aportes que le da el hongo a la planta, que claramente le ayudan a mejorar su desarrollo. Para el caso de las plantas fertilizadas con NO_3 , las plantas que generan mayor biomasa son las control sin micorriza y Pb (nM-Pb+ NO_3) esto indica que la planta crece mejor con esta fuente de nitrógeno, existe una disminución en la Bp cuando las plantas crecen en presencia de Pb debido a la toxicidad de este, y para el caso de las micorrizadas sin plomo (M-Pb+ NO_3) la disminución se puede explicar por la demanda de carbón de parte del HMA a la planta.

La concentración de Pb en los lixiviados no presentó ninguna diferencia significativa entre los tratamientos nM+Pb+ NH_4 , M+Pb+ NH_4 y nM+Pb+ NO_3 lo que puede indicar que la cantidad soluble en el medio es aproximadamente igual para estos tratamientos. Sin embargo, existe un ligero aumento de concentración en el tratamiento M+Pb+ NO_3 , lo indica una mayor solubilización del metal, y que este se encuentra en mayor cantidad libre y por consiguiente esta mas disponible para ser tomado por las plantas, lo que concuerda con los resultados de mayor Cp para este tratamiento.

La concentración de Pb soluble presente en las muestras de lixiviados, está muy relacionada con el pH, y este es un factor importante en la fitorremediación que cobra mucha relevancia en la aplicación de esta tecnología ya que los metales

pesados deben encontrarse en forma soluble para ser tomados por las plantas, lo cual es una de las principales limitantes o retos a los que se enfrenta la fitorremediación de suelos contaminados por metales pesados.

Los datos de pH durante el experimento muestran un cambio significativo de este cuando se presenta la interacción de las variables micorriza y Pb para ambas fuentes de nitrógeno, siendo el mayor para las plantas M+Pb+NO₃, recordemos que el compuesto utilizado como fuente de Pb, es un ácido doble que es poco soluble, ampliamente utilizado en la industria metal mecánica por sus propiedades anticorrosivas y nos ayuda a representar mejor las condiciones reales en las que se encuentra el Pb en los sitios contaminados. Otra característica importante es que tiene propiedades anfotericas, es decir que se puede disociar tanto en pH ácido, como básico, lo cual dado los resultados de la medición del pH y la concentración de Pb presente en los lixiviados nos indica que debido a la interacción micorriza NO₃, se logró solubilizar una mayor cantidad de Pb, esto puede deberse a los ácidos orgánicos de bajo peso molecular, entre otros compuestos exudados por las raíces de las plantas y las hifas de la micorriza, que es un mecanismo natural para solubilizar nutrientes. Todo esto ayudo a que el Pb estuviera más disponible para ser tomado por la planta, lo cual se relaciona y explica por qué las plantas del tratamiento M+Pb+NO₃ son las que presentan una mayor concentración de Pb en sus tejidos de raíz.

La cantidad de metal extraído (Mp) por las plantas fertilizadas con NH₄ fue menor que el de las plantas fertilizadas con NO₃. La inoculación con el HMA para las plantas fertilizadas con NH₄, muestra un ligero decremento en la cantidad de metal extraído, lo que puede ser indicativo de un papel de protección del hongo sirviendo como una especie de barrera que no permite el paso y/o acumulación de Pb. Caso contrario para las plantas fertilizadas con NO₃, en las cuales al estar micorrizadas se tiene un aumento de metal extraído, siendo este el valor máximo de 1200µg alcanzado por las plantas de este tratamiento. Este valor es el de mayor importancia para los trabajos de fitorremediación ya que indica la cantidad de metal que puede ser removido por una planta en función de su biomasa (Bp), por lo cual para el caso de este sistema y para los fines de la tecnología de

fitorremediación resulta más recomendable fertilizar con NO_3 y utilizar la inoculación con el HMA *Glomus intrarradices* ya que con este tratamiento se logra la mayor extracción de Pb a las condiciones ambientales en las que se realizó el experimento.

Todos los resultados obtenidos indican que la planta *Tagetes erecta*, es resistente y capaz de crecer satisfactoriamente en suelos contaminados con Pb, además de mostrar una buena capacidad de acumular el Pb en sus raíces. La fuente de nitrógeno que mostro ser más fue el NO_3 ya que fue la que ayudo más para la solubilidad del Pb. Además que la utilización del HMA *Glomus intrarradices*, ayuda a aumentar la acumulación de Pb en estas condiciones ambientales, esto debido a que la micorriza aumenta el área superficial de las raíces, además de ayudar a la solubilización mediante los compuestos exudados por las hifas. Por lo cual surgió el interés de aumentar dicha acumulación, aumentando el volumen de sustrato y comparar el desarrollo así como la cantidad de Pb extraído por plantas crecidas en 50g y en 135gr.

4.3 VOLUMENES DE SUSTRATO

A pesar de que la concentración de Pb en los tratamientos fue alta (1000mg/kg) las plantas no presentaron grandes síntomas de toxicidad, como podría ser la inhibición severa de crecimiento, la aparición de necrosis o la muerte, entre otros síntomas que se pueden presentar cuando el Pb entra a las células según lo reportado por Burton *et al.*, en 1984.

Las plantas crecidas en 135g de sustrato tuvieron un mejor desarrollo en todos los aspectos comparadas con las crecidas en 50g. Esto debido a que el aumento de volumen de sustrato permitió un mejor desarrollo radicular lo cual claramente beneficio el crecimiento de las plantas. Todas las plantas micorrizadas independientemente del volumen del sustrato en que crecieron presentan un aumento en su desarrollo comparadas con las no micorrizadas, debido a los aportes conocidos del HMA, como es la captación de agua y nutrientes. Por otro lado cuando estas se encuentran en presencia del Pb, pareciera que puede ayudar también en la protección de la toxicidad, sirviendo como protección para la planta no dejando entrar el Pb a estas y dejándolo inmovilizado en sus estructuras como son los micelios y vesículas.

Al analizar las imágenes se vio una posible modificación de la estructura radical de las plantas crecidas en presencia de Pb, esto puede ser una respuesta a la toxicidad del Pb que afecta el desarrollo de estas y/o que tratan de disminuir la absorción del Pb, haciendo que la generación de pelos y raíces secundarias sea menor y aumentando la longitud de la raíz principal. Esto se puede relacionar con los reportes en los cuales se indica que el plomo causa inhibición en el desarrollo de las raíces como uno de sus primeros efectos de toxicidad. (P. Sharma y R. S. Dubey; 2005). Lo anterior se pudo constatar con las mediciones de longitud y del volumen de las raíces. Las plantas crecidas en macetas de 50g cuando no están micorrizadas presentan una disminución en su longitud y volumen en presencia de

Pb, esto por la toxicidad del metal que inhibe el crecimiento de estas, pero cuando se encuentran micorrizadas se presenta un aumento en la longitud y no presentan cambio en el volumen lo que indica un papel importante del HMA ayudando a tolerar mejor el estrés. En las plantas crecidas en 135g se tuvo un mejor desarrollo radicular por el aumento de volumen comparado con las de 50g, además de que las diferencias en longitud y volumen por efecto de la toxicidad del Pb fueron más marcadas. Sin embargo, cuando las plantas están micorrizadas se logra aumentar la longitud por encima de los controles y además la disminución de esta por la toxicidad del Pb es menor, todo esto nos indica que la inoculación con el HMA *Glomus intrarradices* a la planta *Tagetes erecta*, ayuda a tolerar la toxicidad de Pb permitiéndole crecer por encima de las plantas no micorrizadas, lo cual para fines de fitorremediación es muy importante ya que se necesitan plantas que sean capaces de crecer y desarrollarse bien en presencia de metales pesados para poder ser una opción viable para la aplicación de estas en suelos contaminados.

La colonización de las raíces de plantas de *Tagetes erecta* por el HMA *Glomus intrarradices* fue alrededor del 70% y se volvió a ver el aumento en el número de estructuras internas del hongo, (vesículas) lo cual confirma los resultados del experimento anterior de que cuando las plantas inoculadas crecen en presencia de Pb, el aumento de estas es muy claro, lo que tal como muestran los reportes puede ayudar a aumentar la cantidad de Pb atrapado en las raíces, ya que estas presentan una gran afinidad para que el Pb se quede adherido a sus paredes.

La concentración de Pb en las plantas Cp es mucho mayor en las raíces que en las partes aéreas de todos los tratamientos. Cuando las plantas crecen en macetas de 50g las concentraciones de Pb en las raíces Cp_{PR}, son menores que cuando se crecen en macetas de 135g, ya que estas presentan un aumento hasta del 100% en el caso de las **nM+Pb** comparadas con las mismas plantas crecidas en 50g, esto muestra claramente que al aumentar la cantidad de volumen de sustrato disponible para el crecimiento de las plantas, se logra incrementar de una manera muy importante la cantidad de plomo atrapado en las raíces, ya que al

existir un mayor espacio para desarrollarse, estas están en contacto con una mayor cantidad de Pb, es decir que se aumenta el área de contacto. Las plantas no micorrizadas fueron las que presentaron los mayores valores de C_{pR} esto puede deberse posiblemente a que las condiciones ambientales de humedad y temperatura durante el experimento, afectaron la absorción de Pb por las raíces de las plantas micorrizadas, ya que la humedad fue muy alta (cercana al 80%) y esto afecta la transpiración y el potencial del agua, debido que las plantas se mantuvieron con riego diario para asegurar capacidad de campo, el gradiente hídrico fue bajo; además, la temperatura fue más baja (23°C) lo cual se sabe que afecta la difusión de las moléculas, estos dos factores pueden ser los responsables que el transporte y absorción en las plantas micorrizadas fuera menor ya que se sabe que las micorrizas ayudan a meter más agua a las plantas lo cual disminuye aún más el gradiente de transferencia de agua de la planta al ambiente y con esto el transporte de Pb a las raíces.

La concentración de Pb en las partes aéreas C_{pPA} , también mostro un efecto positivo con el aumento de volumen de sustrato, con un incremento también del 100% para las plantas crecidas de 135g, esto debido a que aumento de Pb en la raíz provoca que exista un mayor transporte a parte aérea, sin embargo al no existir transportadores específicos para Pb, este transporte se da por el gradiente de concentración es decir por difusión. A pesar de todo esto el factor de translocación (TF) para todos los tratamientos fue muy bajo y no existió una diferencia entre las plantas crecidas en 50g y las crecidas en 135g lo cual indica que la relación que existe entre la cantidad de metal absorbido por las raíces y el acumulado en la parte aérea es constante y no depende del aumento del volumen de sustrato disponible para el crecimiento de la planta, ni de la presencia del HMA, sino que es un efecto simplemente de gradientes de concentración, ya que el plomo no es un elemento esencial para las plantas y no existen en estas transportadores para él.

El aumento de volumen de sustrato para crecimiento también ayudo para mejorar el desarrollo del área foliar de las plantas, siendo las plantas crecidas en

135g, sin micorrizas y Pb, las que alcanzaron el mayor valor, esto debido a que las condiciones de crecimiento para estas plantas son más adecuadas de todos los tratamientos, ya que las condiciones de estrés que pueden representar la presencia de Pb y/o el HMA no se encuentran presentes. Para el caso de las plantas micorrizadas se volvió a presentar la inhibición de la reducción del área foliar por la presencia de Pb, caso contrario con las plantas no micorrizadas donde se presenta dicha disminución, esto viene a confirmar que la presencia del HMA juega un papel importante en la tolerancia al estrés, permitiéndole a la planta continuar con su desarrollo. No obstante existe la disminución en la biomasa de las plantas Bp, debido a la presencia de Pb, se aprecia un aumento en la biomasa por el aumento de volumen de sustrato de crecimiento, siendo este máximo para las plantas micorrizadas crecidas en 135g y en ausencia de Pb, esto indica que dicho aumento de volumen ayuda a un mejor desarrollo del HMA y este maximiza su aporte a la planta, lo que no se logra cuando el volumen de sustrato es de 50g, en las mismas condiciones ambientales y mismo periodo de crecimiento.

La concentración de Pb presente en los lixiviados no mostro grandes cambios entre los tratamientos sin embargo existe una clara relación de estas con los valores de pH, ya que para los valores de concentración más bajos que son los de los tratamientos nM-Pb y **M+Pb** los valores de pH son 5.5 y 5.3 respectivamente y los valores mayores de concentración en los tratamientos M+Pb y **nM-Pb**, presentaron unos valores de pH de 5.4, lo que demuestra que la solubilidad es extremadamente sensible a los pequeños cambios en el pH y esto impacta seriamente con la eficiencia de la fotorremediación de Pb.

Del análisis de la fracción de Pb absorbido en las raíces hecho mediante la cuantificación de Pb en la solución surfactante con la que se lavaron las raíces de la plantas (crecidas en 50g), se encontró que las raíces no micorrizadas desprendieron una mayor cantidad de Pb comparado con las plantas micorrizadas, lo cual indica que las raíces de plantas micorrizadas presentan una mayor capacidad de retención de Pb, esto se corroboró cuando se midió la concentración de Pb en los tejidos de estas raíces encontrando que las plantas micorrizadas

presentaron un mayor C_{pPR} que las no micorrizadas, lo cual concuerda con los reportes sobre la afinidad de las estructuras de los HMA con los metales pesados, la cual es 2-5 veces mayor que las raíces solas (Joner *et al.*, 2000), la afinidad para este caso es 2.53 mayor cuando las plantas se encuentran micorrizadas, es decir, que, el Pb se encuentra más fuertemente atascado que en las raíces de plantas no micorrizadas. Además, Castillo (2011) modeló la respuesta del mismo sistema estresado por Cu encontrando un valor de afinidad de 4.

Cuando se compara los C_{pPR} de las plantas tratadas contra el C_{pPR} de las plantas sin tratar, encontramos que la disminución en la concentración de Pb en las raíces micorrizadas es menor. Esto es muy interesante ya que demuestra que aunque en estas condiciones ambientales las plantas micorrizadas tienen menor concentración de Pb en las raíces que las no micorrizadas, este se encuentra más fuertemente atrapado en las plantas micorrizadas lo que para la fitorremediación y específicamente para la fitoestabilización que es la subtecnología de la que se está hablando en este caso es más conveniente que las plantas se encuentren micorrizadas ya que el Pb estará así más fuertemente inmovilizado por las plantas.

El parámetro que al final es el más importante para la fitorremediación es la cantidad de metal extraído M_p , el cual fue alrededor de un 30% mayor en el caso de las plantas no micorrizadas para ambos volúmenes de sustrato. Sin embargo se logró un aumento hasta del 100% de la cantidad de Pb extraído en las plantas crecidas en 135g. Lo cual quiere decir que al aumentar el volumen de sustrato se incrementa favorablemente la extracción de Pb, esto se puede explicar claramente con los datos que demuestran que dichas condiciones de crecimiento ayudan a mejorar el desarrollo de las plantas lo cual termina impactando en el incremento del M_p , ya que este depende directamente de la concentración de metal en la planta y la biomasa de esta, es decir, que al mejorar las condiciones de desarrollo de la misma y/o la concentración de metal absorbido se logra eficientar la fitorremediación, que en este caso específico se realiza a través de una fitoestabilización del Pb por las raíces de las plantas.

A pesar de que en estas condiciones ambientales las plantas no micorrizadas lograron remover una mayor cantidad de Pb que las micorrizadas, se demostró que la micorrización es importante, ya que con esta se ayuda a las plantas a tolerar mejor el estrés causado por el Pb y este queda más fuertemente atrapado en las raíces debido a la afinidad que presentan los HMA la cual es mayor que la de las raíces. Además, de que, el tener un mayor volumen de sustrato para desarrollarse ayuda a incrementar la cantidad de metal extraído de una forma muy importante. Todos estos resultados obtenidos son bastante interesantes y prometedores para los fines de la fitorremediación ya que ayudan a entender como es el comportamiento de la planta *Tagetes erecta* y el HMA *Glomus intrarradices* y su interacción en presencia de Pb.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- Las plantas de *Tagetes erecta* presentan tolerancia para crecer en suelo contaminado con altas concentraciones de plomo. Además son capaces de acumular el Pb en las raíces.
- La simbiosis de la planta *Tagetes erecta* con el HMA *Glomus intrarradices*, ayuda a la planta a tolerar mejor el estrés causado por el Pb, permitiéndoles desarrollarse satisfactoriamente.
- Las plantas de *Tagetes erecta* micorrizadas tienen una mayor afinidad para absorber el Pb en las raíces que las plantas no micorrizadas.
- La cantidad de Pb acumulado por las plantas así como el papel del HMA *Glomus intrarradices*, está ligado a las condiciones ambientales como la temperatura y la humedad.

APENDICES

Apéndice 1

Medio mínimo para crecimiento de micorrizas *in vitro* (con NO₃) desarrollado por Bécard y Fortin (1988).

REACTIVO	STOCK para 100 ml	ADICIÓN ml / l
MgSO ₄ 7 H ₂ O	7.31 g	10 ml / l
KNO ₃	0.500 g	16 ml / l
KCl	0.500 g	13 ml / l
KH ₂ PO ₄	0.100 g	4.8 ml / l
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	1.0 g	28.8 ml / l
NaFe EDTA	0.100 g	8 ml / l
KI	0.010 g	7.5 ml / l
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.100 g	6.0 ml / l
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.100 g	2.65 ml / l
H ₂ BO ₃	0.100 g	1.5 ml / l
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.010 g	1.3 ml / l
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.010 g	0.024 ml / l = 24µl
GLICINA	0.100 g	3 ml / l
TIAMINA	0.100 g	0.1 ml / l = 100µl
PIRIDOXINA	0.100 g	0.1 ml / l = 100µl
Ac. NICOTÍNICO	0.500 g	0.1 ml / l = 100µl
MIOINOSITOL	0.500 g	10 ml / l

SACAROSA	10 g / l
FITAGEL	4 g / l
pH	5.5

OBSERVACIONES:

- Cuando se prepare este medio, debe considerarse el volumen final real a fin de evitar aumento del mismo (poner un volumen de agua menor que el preparado debido a que la mayor parte de los componentes se encuentran en stock y esto aumentaría el volumen final).
- Después de ajustar el pH; aforar la solución al volumen deseado y agregar el fitagel, poco a poco y agitando si el medio lo requiere.
- Esterilizar a 120° C durante 20 min.

Apéndice 2

Técnica para tinción de micorrizas desarrollada por Vierhelig, *et al* (1998)

1).- Cuando el material biológico (raíces) va a ser transportado por espacio prolongado de tiempo (horas y/o días) antes de ser analizado en el laboratorio; es conveniente mantener las raíces en una bolsa *ziplock* con una solución: etanol – agua (1:1).

2).- Las raíces se colocan en una charola para limpiarlas; es decir para quitar los excesos de sustrato (suelo o cualquier sustrato inerte). Para poder obtener una buena tinción deben ser retiradas las raíces dañadas, envejecidas o muy engrosadas. En la misma charola se acomodan las raíces a lo largo para hacer cortes con una hoja de bisturí o un *cutter* de 1cm de largo aproximadamente.

3).- De esta manera las raíces se pasan a unas “cajitas” llamadas casetes o rejillas (ver figura 1) las cuales constan de orificios para permitir la entrada y salida de líquidos. Los casetes deben ser etiquetados con lápiz de grafito (ningún tipo de marcador indeleble).

4).- Para el blanqueamiento de las raíces se prepara KOH al 10%, el volumen a preparar va a depender de la cantidad de muestras para teñir.

5).- Se pone a calentar el KOH en un vaso de precipitados sobre una parrilla magnética y cuando alcanza su punto de ebullición se meten con mucho cuidado los casetes, una vez reiniciado el proceso de ebullición se toma el tiempo para el blanqueamiento (10 minutos) o hasta que la solución de KOH se torna de un color café amarillento. Este tiempo puede variar dependiendo de las raíces de la planta que se trate o bien de la consistencia de las mismas. Transcurrido el tiempo de aclareo enjuagar en la tarja al chorro del agua de 10 a 15 minutos.

6).- Para la tinción de las raíces se prepara una solución de vinagre blanco con

tinta china negra (sheafer) al 5 %. Dependiendo del número de muestras para teñir se puede preparar 1000 ml o 500 ml de solución; es decir, 950 ml (vinagre blanco): 50 ml (tinta china), o bien podría ser 475 ml (vinagre blanco) : 25 ml (tinta china) u otro volumen menor.

7).- Se pone a calentar en un vaso de precipitados la solución de vinagre/tinta cuando ha alcanzado su punto de ebullición se meten con mucho cuidado los casetes, una vez reiniciado el proceso de ebullición se toma el tiempo para la tinción (5 a 7 minutos).

Transcurrido este tiempo se sacan con mucho cuidado los casetes (con una cuchara o pinzas) poniéndose en otro vaso de precipitados al chorro del agua por espacio de 10 a 15 minutos, hasta que el agua de enjuague esté clara.

8).- Los casetes o rejillas se colocan en una charola de plástico, las raíces** de cada casete se ponen en una caja de Petri con poco agua y con la ayuda de una aguja de disección o unas pinzas finas se tratan de separar las raíces para colocarlas en portaobjetos.

9).- Se ponen 10 segmentos de raíz en cada portaobjetos debidamente etiquetado. Estos segmentos deberán de ser lo más uniformes posible procurando que sean todos del mismo tamaño es decir, de 1cm. de largo aproximadamente. Se coloca con un gotero un poco de agua con mucho cuidado para que no se muevan las raíces y de esta manera se coloca el cubreobjetos.

10).- De esta manera las raíces pueden ser observadas al estereoscopio o bajo el microscopio óptico para evaluar el porcentaje de colonización micorrízica.

**Las raíces sobrantes se pueden guardar en bolsitas de plástico debidamente etiquetadas poniéndolas en agua con un poco de vinagre. De esta manera se pueden conservar de dos a tres meses.

Apéndice 3

Porcentaje de colonización micorrízica desarrollado por Biermann y Linderman (1981).

1).- Antes de realizar la observación al microscopio colocar unas gotas de una solución de agua–glicerina en el portaobjetos y después se colocan las raíces, se cubren con un cubreobjetos evitando la formación de burbujas.

2).- Para llevar a cabo la evaluación se observara con el objetivo de 10x. Cada segmento de raíz (longitud 10mm) deberá revisarse cada 2mm; de tal manera que cada uno de éstos deberá dividirse en cinco puntos para su observación a todo lo largo del segmento.

3).- La presencia o ausencia de estructuras internas micorrizicas será reportada como (+) ó (-) respectivamente según sea el caso. Si el campo de observación lo permite contar estructuras como: arbusculas, esporas y/o vesículas.

4).- Para evaluar colonización micorrízica se le da un valor de 20% a cada uno de los cinco puntos (≈2mm) de cada segmento; esto, siempre que se haya observado alguna estructura micorrízica. Si hay ausencia de estas estructuras entonces el valor será de 0% de tal suerte que si los cinco puntos observados presentan alguna estructura, ese segmento tendrá un valor de 100%. Este mismo proceso se hará para los nueve segmentos restantes de los 10 montados en cada preparación.

Al final se hará la sumatoria total de los porcentajes obtenidos de los segmentos observados dividiéndose entre el número de segmentos (10) para obtener el porcentaje promedio de la preparación. Ejemplo:

$$\text{Promedio de Porcentaje de Colonización total} = \frac{\text{Porcentaje de colonización de los segmentos}}{\text{Número de segmentos totales}}$$

Referencias

Abollino O., M. Aceto, M. Malandrino, E. Mentaste, C. Sarzanini y R. Barberis. 2002. **Distribution and Mobility of Metals in Contaminated Sites. Chemometric Investigation of Pollutant Profiles.** Environmental Pollution, 119, p. 177.

Aitcheson L. 1960. **A History of Metals.** London: Mac Donalds and Evans.

Alarcón A., S.R. Almaraz, M.C. Ferrera-Cerrato, A.M. González-Chavez, E.H. Lara, M. Manjarrez, L.R. Quintero, S.R. Santamaría. 2004. **Manual: Tecnología de hongos micorrizicos en la producción de especies vegetales en vivero.** Colegio de posgraduados, montecillo. SAMARNAT-PRONARE. México. 33-73 pp.

Alloway B. J. 1995. **Soil processes and the behavior of metals.** En: Alloway, B.J. (Ed.) **Heavy metals in soils.** London, England. pp: 38–57.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry 2005. **Division of Toxicology. ATSDR** Information Center: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaq.html#bookmark05>.

Aranguren F. 1999. **El Plomo En El Medio Geográfico: Una Amenaza Saliente.** geoenseñanza Vol. 4 ISSN 1316-6077,121-155.

Arriagada M.A., M.A Herrera., J.A. Ocampo. 2005. **Contribution of arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi to the tolerance of Eucalyptus globulus to Pb.** Water Air Soil Poll. 166, 31–47.

Asada K. 1994. **Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues.** In: Foyer C, Mullineaux PM (eds), **Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants.** Boca Ratón, London. 77-100.

Baker A.J.M. 1981. **Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals.** J. Plant Nutr. 3, 643-654.

Banat K. M., F. Howari y A.A. Al-Hamad. 2005. **Heavy Metals in Urban Soils of Central Jordan: Should we Worry about Their Environmental Risks.** Environmental Research, 97, pp. 258-273.

Bert V., P. Meerts, P. Saumitou-Laprade, P. Salis, W. Gruber y N. Verbruggen. 2003. **Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*.** *Plant and Soil* 249:9- 18.

Berti W. R. y S. D. Cunningham. 2000. **Phytostabilization of metals.** En: Raskin I. y B. Ensley (Eds.) **Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment.** Wiley Interscience, New York, USA. pp: 71-88.

Blaylock M.J., D.E .Salt, S. Dushenkov, O. Zakharova, C. Gussman, Y. Kapulnik, B.D. Ensley, I. Raskin. 1997. **Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents.** Environ. Sci. Technol. 31, 860-865.

Bosiacki M. 2008. **Accumulation of cadmium in selected species of ornamental plants.** *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 7:21-31.

Bosiacki M. 2009a. **Phytoextracion of cadmium and lead by selected cultivars of *Tagetes erecta* L. Part I. Effect of Cd and Pb on yielding.** *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 8:3-13.

Bosiacki M. 2009b. **Phytoextracion of cadmium and lead by selected cultivars of *Tagetes erecta* L. Part II. Contents of Cd and Pb in plants.** *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 8:15-26.

Bouwman L.A., J. Bloem, P.F.A.M. Romkens, G.T. Boon, J. Vangronsveld. 2001. **Beneficial effects of the growth of metal tolerant grass on biological and chemical parameters in copper- and zinc contaminated sandy soils.** MINERVA BIOTECNOLOGICA, 13(1): 19-26

Brown S. L., R.L. Chaney, J.G. Hallfrisch y Qi Xue. 2003. **Effect of Biosolids Processing On Lead Bioavailability in an Urban Soil.** Environ Qual 32, 100-108.

Buka I. 2001. **Plomo y Salud Infantil.** Boletín de la Comisión para la Cooperación Ambiental de América Del Norte.

Burt R., M.A. Wilson, T.J. Keck, B.D. Dougherty, D.E. Strom, J.A. Lindahl. 2003. **Trace Element Speciation in Selected Smelter-Contaminated Soils in Anaconda and Deer Lodge Valley, Montana, USA.** Advances in Environmental Research, 8, pp. 51-67.

Burton K.W., E. Morgan, A. Roig. 1984. **The influence of heavy metals on the growth of sitkaspruce in South Wales forests in greenhouse experiments.** Plant Soil. 78, 271-282.

Burzynski M. 1987. **The influence of lead and cadmium on the absorption and distribution of potassium, calcium, magnesium and iron in cucumber seedlings.** Acta Physiol. Plant. 9:229-238.

Castillo O. S., N. Dasgupta-Schubert, C. J. Alvarado, E. M. Zaragoza y H. J. Villegas. 2011. **The effect of the simbiosis between *Tagetes erecta* L. (marigold) and *Glomus intraradices* in the uptake of copper (II) and its implications for phytoremediation.** *New Biotechnology* DOI:10.1016/j.nbt.2011.05.009.

Capaccio L.V.M. y J.A. Callow. 1982. **The enzymes of polyphosphate metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizas.** New Phytol. 91, 81-91.

Chaitanya KSK, S.B. Naithani. 1994. **Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss in viability of seeds of *Shorea robusta* Gaertn. F.** *New Phytol.* 126:623-627.

Chaney R.L. 2008. **Anthropogenic contamination of urban soils: sources, risks, remediation.** Joint Meeting of the Geological Society of America.

Chen X., C. Wu, J. Tang, S. Hu. 2005. **Arbuscular mycorrhizae enhance metal lead uptake and growth of host plants under a sand culture experiment.** *Chemosphere.* 60, 665–671.

Chen, Y.H., X.D. Li, , Z.G. Shen. 2004a. **Leaching and uptake of heavy metals by ten different species of plants during an EDTA-assisted phytoextraction process,** *Chemosphere* 57, 187-196

Chen B., P. Christie, y L. Li. 2001. **A Modified Glass Bead Compartment Cultivation System for Studies on Nutrient and Trace Metal Uptake by Arbuscular Mycorrhiza.** *Chemosphere* 42, 185-192.

Christie P., X. Li, B. Chen. 2004. **Arbuscular Mycorrhiza can Depress Translocation of Zinc To Shoots of Host Plants in Soils Moderately Polluted with Zinc.** *Plant and Soil*, 261 (1-2), 209-217.

Clemens S. 2001. **Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis.** *Planta.* 212, 475-486.

Davies B.E. 1995. **Lead and other heavy metals in urban areas and consequences for the health of their inhabitants.** In: Majumdar SK, Miller EW, Brenner FJ (eds), *Environmental Contaminants, Ecosystems and Human Health*, pp.287-307. The Pennsylvania Academy of Science, Easton PA, USA.

El Seoud A. 2008. **Phosphorus Efficiency of Tagetes Plant Inoculated with Two Arbuscular Mycorrhizal Fungi Strains.** Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 2(2): 234-242.

Entry J.A., P.T. Rygiewicz, L.S. Watrud, P.K. Donnelly. 2002. **Influence of adverse soil conditions on the formation and function of arbuscular mycorrhizas.** Adv Environ Res. 7:123–138.

Emsley J. 1994. **Ancient World was Poisoned by Lead.** En: New Scientist, 143: 14.

Ernst W.H.O. 2000. **Evolution of Metal Hyperaccumulation and Phytoremediation.** New Phytol 146, 357-357.

Ernst W.H.O. (1998). **Effects of heavy metals in plants at the cellular and organismic levels.** En: Schuurmann G (ed), **Ecotoxicology: Ecological Fundamentals, Chemical Exposure and Biological Effects.** Wiley, Heidelberg, pp. 587-620.

Ezawa T., S.E. Smith, F.A. Smith. 2001. **Differentiation of polyphosphate metabolism between the extra- and intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi.** New Phytol. 149, 555–563.

Frick C.M., R.E. Farrell y J.J. Germida. 1999. **Assessment of Phytoremediation as an in situ Technique for Cleaning Oil-Contaminated Sites.** Petroleum Technology Alliance of Canada. Vancouver, British Columbia.

Galli U., H. Schüepp, C. Brunold. 1994. **Heavy metal binding by mycorrhizal fungi.** *Physiol. Plantarum.* 926, 364-368.

-
- García, I., Dorronsoro, C. 2005. **Contaminación por Metales Pesados. En Tecnología de Suelos.** Universidad de Granada. Departamento de Edafología y Química Agrícola. <http://edafologia.ugr.es/conta/tema15/introd.htm>
- Gaur A. y A. Adholeya. 2004. **Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils.** *Current Sci.* 86, 528–534.
- Gederman J.W. y J.M. Trappe. 1974. **The Endogonaceae in the pacific northwest.** *Mycologia*, memoir No. 5.
- Granadillo V. 1993. **Concentraciones de Plomo en Sangre de la Población de la Ciudad de Maracaibo.** Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela, p.1- 110.
- Godzik B. 1993. **Heavy metal contents in plants from zinc dumps and reference area.** *Pol. Bot. Stud.* 5:113-132.
- Göhre V. y U. Paszkowski. 2006. **Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation.** *Planta.* 223, 1115–1122.
- González-Chávez M.C., R. Carrillo-González, S.F. Wright, K.A. Nichols. 2004. **The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements.** *Environ Pollut.* 130, 317–323.
- Guitart R. y G.T. Vernon. 2005. **Revista Española de Salud Pública V.79 No.6** Madrid Nov. - ISSN 1135-5727.
- Hall J. L. 2002. **Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance.** *Journal of Experimental Botany* 53:1-11.
- Han F.X., A. Banin, W.L. Kingery, G.B. Triplett, Zhou, L.X., Zheng, S. J., Ding, W.X., 2003. **New Approach to Studies of Heavy Metal Redistribution in Soil.** *Advances in Environmental Research*, 8, pp. 113-120.

Hansen D, P.J Duda, A. Zayed, N. Terry. 1998. **Selenium removal by constructed wetlands: role of biological volatilization.** Environ Sci Technol 32:591-597

Harrison M.J. y M.L. Van Buuren. 1995. **A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*.** Nature. 378, 626-629.

Harrison M.J. 1999. **Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis.** Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50, 361–389.

Harter, R.D. 1983 **Effect of Soil pH on Adsorption of Lead, Copper, Zinc, and Nickel.**

Soil Sci. Soc. Am. J. 47, 47–51

Huang C.P. 1999. **Environmental Soil Chemistry and Human Welfare.** 14° Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo. Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. Temuco. Chile.

Joner E.J., R. Briones, C. Leyval. 2000. **Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium.** Plant Soil. 226, 227–234.

Kabata-Pendias A. 2000. **Trace elements in soils and plants.** Third Edition. CRC Press, Inc. Boca Ratón, USA. pp: 365, 413.

Kojima T., M. Hayatsu, M. Saito. 1998. **Intraradical hyphae phosphatase of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*.** Biol. Fert. Soils. 26, 331-335.

Kramer U. 2005. **Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils.** Curr. Opin. Biotechnol. 16, 133–141.

Kupper H., E. Lombi, F.I. Zhao, S.P. McGrath. 2000. **Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri***. *Planta*, 212, 75-84.

Lanfranco L., A. Bolchi, E.C. Ros, S. Ottonello, P. Bonfante. 2002. **Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of an arbuscular mycorrhizal fungus**. *Plant Physiol.* 130, 58-67.

Lañe S.D., E.S. Martin. 1977. **A histochemical investigation of lead uptake in *Raphanus sativus***. *New Phytol.* 79:281-286.

Lasat M.M. 2002. **Phytoextraction of toxic metals – A review of biological mechanisms**. *Journal of Environmental Quality* 31:109–120.

Lee S.Z., L. Chang, H.H. Yang, C.M. Chen, M.C. Liu. 1998. **Absorption characteristics of lead onto soils**. *J. Haz. Mat.* 63:37-49.

Lombi E., F. Zhao, S. McGrath, S. Young y G. Sacchi. 2001a. **Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype**. *New Phytologist* 149:53-60.

Lombi E., F. J. Zhao, S. J. Dunham y S. P. McGrath. 2001b. **Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction**. *Journal of Environmental Quality* 30:1919-1926.

Lucero ME, W. Mueller, J. Hubstenberger, G.C. Phillips, M.A. O'Connell. 1999. **Tolerance to nitrogenous explosives and metabolism of TNT by cell suspensions of *Datura innoxia***. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 35:480-486

Maldonado-Mendoza I.E., G.R. Dewbre, M.J. Harrison. 2001. **A phosphate transporter gene from the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment.** *Mol. Plant Microbe In.* 14, 1140-1148.

Martin C.W. 2000. **Heavy Metals Trends in Floodplain Sediments and Valley Fill.** *Catena* 39, 53-68.

Marseille F., C. Tiffreau, A. Laboudigue, Lecomte. 2000. **Impact of vegetation on the mobility and bioavailability of trace elements in a dredged sediment deposit: a greenhouse study.** *Agronomie*, 20: 547-556.

Matte T.D. 2003. **Efectos del Plomo en la Salud de la Niñez.** Vol. 45 ISSN: 00363634 Pág. 220-224.

McBride M.B. 1994. **Environmental chemistry of soils.** Oxford University Press, New York, 406 p.

McGrath S.P, E. Lombi, F.J. Zhao, y S.J. Dunham. 2001. **Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Soils: Natural Hyperaccumulation Versus Chemically Enhanced Phytoextraction.** *Journal of Environmental Quality* 30(6): 1919-1926.

McIntyre T. 2003. **Phytoremediation of heavy metals from soils.** *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 78:97-123.

Merkel N., R. Schultze-Kraft, C. Infante. 2005. **Phytoremediation in the tropics influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids.** *Environmental Pollution*, 138: 86-91

Morselt A.F.W., W.T.M. Smits, T. Limonard. 1986. **Histochemical demonstration of heavy metal tolerance in ectomycorrhizal fungi.** *Plant Soil.* 96, 417-420.

Morton J.M. y J.L. Benny. 1990. **Revised of clasification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glominae and Gigasporinae, and two new families, acaulosporaceae, with an inmendation of glomaceae.** Mycotaxon. 37: 471-491.

Narayanan MT, J.C. Tracy, L.C. Davis, L.E. Erickson. 1998. **Modeling the fate of toluene in a chamber with alfalfa plants 2. Numerical results and comparison study.** J of Hazardous Substance Research 1:5b-1 - 5b-28

Newman L, S. Strand, N. Choe, J. Duffy, G. Ekuan, M. Ruszaj, B. Shurtleff, J. Wilmoth, P. Heilman y M. Gordon. 1997. **Uptake and biotransformation of trichloroethylene by hybrid poplars.** *Environmental Science and Technology* 31:1062-1067.

Norvell, W. A. 1984. **Comparison of Chelating Agents as Extractants for Metals in Diverse Soil Materials.** Soil Sci. Soc. Am. J. 48: 1285–1292

Norvell, W. A. 1991. **Reactions of metal chalates in soils and nutrient solutions.** In: Mortvedt, J.J., Cox, F.R. Shuman, L.M. and Welch, R.M., Editors, 1991. Micronutrients In Agriculture, 2nd Edition, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, 187-227.

Nowak J. 2007. **Effects of cadmium and lead concentrations and arbuscular mycorrhizal on growth, flowering and heavy metal accumulation in scarlet sage (Salvia splendens sello ‘torreador’).** Acta Agrobot. 60: 79-83.

Pagnanelli F., E. Moscardini, V. Giuliano, L. Toro. 2004. **Sequential Extraction of Heavy Metals in River Sediments of an Abandoned Pyrite Mining Area: Pollution Detection and Affinity Series.** Environmental Pollution, 132, 189-201.

Pawlowska T.E. y I. Charvat. 2004. **Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi.** Appl. Environ. Microbiol. 70, 6643–6649.

Peer W.A., I.R. Baxter, E.L. Richards, J.L. Freeman, A.S. Murpy. 2006. **Phytoremediation and hyperaccumulator plants.** Topics in Current Genetics. 14, 84.

Pieper DH, V.A.P. Martins dos Santos, P.N. Golyshin. 2004. **Genomic and mechanistic insights into the biodegradation of organic pollutants.** Curr Opin Biotechnol 15:215-224

Pineda H.R. 2004. **Presencia de Hongos Micorrízicos Arbusculares y Contribución de Glomus Intraradices en la Absorción y Translocación de Cinc y Cobre en Girasol (Helianthus Annuus L.) Crecido en un Suelo Contaminado con Residuos de Mina.** Tesis para Obtener el Grado de Doctor en Ciencias Universidad de Colima. Tecoman, Colima.

Prasad M.N.V. y H.M. Freitas. 2003. **Metal Hyperaccumulation In Plants Biodiversity Prospecting For Phytoremediation Technology.** Electronic Journal of Biotechnology 6 (3). 285– 321.

Pulfort I.D. y C. Watson. 1993. J. Environ. Inten. 29:529-540

Rabie G.H. 2005. **Contribution of arbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal-polluted soil.** African J. Biotechnol. 4, 332-345.

Redecker D., R. Kodner y L. E. Graham. 2000. **Glomalean fungi from the Ordovician,** *Science* 289:1920-1921.

Reeves R. D. y A. J. M. Baker. 2000. **Metal-accumulating plants**. En: Raskin I. y B. D. Ensley (Eds.) **Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment**. John Wiley & Sons, Inc, New York, USA. pp: 193-229.

Robinson B., J. E. Fernández, P. Madejón, T. Marañón, J. M. Murillo, S. Green, *et al.* 2003. **Phytoextraction: An assessment of biogeochemical and economic viability**. *Plant and Soil* 249:117–125.

Rubin E, A. Ramaswami. 2001. **The potential for phytoremediation of MTBE**. *Water Res* 35:1348-1353

Rugh C. L., J. F. Senecoff, R. B. Meagher y S. A. Merkle. 1998. **Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation**. *Nature Biotechnology* 16:925-928.

Rzedowski G. C. y J. Rzedowski. 2001. **Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad**. Pátzcuaro, Michoacán, México. p 922. Edición digital http://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/Indice_Flora_del_Valle_de_Mx.pdf

Saito M. 1995. **Enzyme activities of the internal hyphae and germinated spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, Gigaspora margarita Becker & Hall**. *New Phytol.* 129, 425-431.

Salt D. E., R. D. Smith y I. Raskin. 1998. **Phytoremediation**. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49:643-668.

Sauquillo A., A. Rigol y G. Rauret. 2003. **Overview of the use of Leaching/Extraction Tests for Risk Assessment of Trace Metals in Contaminated Soils and Sediments**. *Trends in Analytical Chemistry*, 22, pp. 152-159.

Sauve S., W. Henderson y H.E. Allen. 2000. **Solid-Solution Partitioning of Metals in Contaminated Soils: Dependence on pH, Total Metal Burden, and Organic Matter.** *Environ. Sci. Technol.* 34:1125–1131.

Schnoor J., L. Licht, S. Mccutcheon, N. Wolfe y L. Carreira. 1995. **Phytoremediation of organic and nutrient contaminants.** *Environmental Science and Technology* 29:A318-A323.

Schüpler A., D. Schwarzott y C. Walker. 2001. **A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution.** *Mycological Research* 105:1413-1421.

Seoáñez Calvo M, 1999. **Ingeniería del Medio Ambiente Aplicada al Medio Natural.** Continental Mundi-Prensa, México. Pág. 60, 181y 290

Singh O. V., S. Labana, G. Pandey, R. Budhiraja y R. K. Jain. 2003. **Phytoremediation: an overview of metallicion decontamination from soil** *Applied Microbiology and Biotechnology* 61:405–12.

Spain A. 2003. **Implications Of Microbial Heavy Metals Tolerance in the Environment.** *Reviews In Undergraduate Research*, 2,1-6.

Stottmeister U., A. Wießner, P. Kusch, U. Kappelmeyer, M. Kästner, and O. Bederski. 2003. **Effects of Plants and Microorganisms in Constructed Wetlands for Wastewater Treatment.** *Biotechnology Advance.* 93–117.

Suresh B. y G. Ravishankar. 2004. **Phytoremediation - A novel and promising approach for environmental clean-up.** *Critical Reviews in Biotechnology* 24:97-124.

Sylvia D.M. y S.E. Williams. 1992. **Vesicular–arbuscular mycorrhizae and environmental stresses**. In: **Bethlenfalvay GJ, Linderman RG (eds) Mycorrhizae in Sustainable Agriculture**. ASA Spec. Publ. No. 54. Madison, pp 101–124.

Turnau K., I. Kottke, F. Oberwinkler. 1993. **Elemental localization in mycorrhizal roots of *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn collected to experimental plots treated with cadmium dust**. *New Phytol.* 123, 313-324.

Valdés P.F. 1999. **La Contaminación Por Metales Pesados en Torreón Coahuila**. En *Defensa del Ambiente A.C Torreón Coahuila*.

Van Huysen T, N. Terry, E.A.H. Pilon-Smits. 2004. **Exploring the selenium phytoremediation potential of transgenic Indian Mustard overexpressing ATP sulfurylase or cystathionine- γ -synthase**. *Int J Phytoremediation* 6:1-8

Verma S. y R.S. Dubey. 2003. **Lead toxicity induces lipid per-oxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants**. *Plant Sci.* 164:645-655.

Vierheilig H., A. P. Coughlan, U. Wyss y Y. Piché. 1998. **Ink and vinegar, a simple staining technique for Arbuscular–Mycorrhizal fungi**. *Applied and Environmental Microbiology* 64:5004–5007

Vodnik D., H. Grčman, I. Maček, J.T. Van Elteren, M. Kovačević. 2008. **The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil**. *Sci. Total Environ.* 392, 130-136.

Volke S.T., T.J.A Velasco y A. De La Rosa. 2005. **Suelos Contaminados por Metales y Metaloides: muestreo y alternativas para su remediación**. S y G Editores, S.A. de C.V., México, D. F. ISBN: 968-817-492-0

Wang J. y V. P. Evangelou. 1994. **Metal tolerance aspects of plant cell walls and vacuoles.** En: Pessaraki M. (Ed.) **Handbook of Plant and Crop Physiology.** Marcel Dekker, Inc, New York, USA. pp. 695-717.

Wang Y.P., y C.C. Chao. 1992. **Effects of Vesicular- Arbuscular Mycorrhizae and Heavy Metals on the Growth of Soybean and Phosphate and Heavy Metal Uptake by Soybean in Major Soil Groups of Taiwan.** J. Agric. Assoc. China New. Ser. 157, 6-20.

Wong C.C., S.C. Wu, C. Kuek, A.G. Khan, M.H. Wong. 2007. **The role of mycorrhizae associated with vetiver grown in Pb-/Zn-contaminated soils: Greenhouse study.** Restor. Ecol. 15, 60–67.

Wu J., F. Hsu y S. Cunningham. 1999. **Chelate-assisted Pb phytoextraction: Pb availability, uptake, and translocation constraints.** *Environmental Science and Technology* 33:1898-1904.

Xiong Z.T. 1997. **Bioaccumulation and Physiological Effects of Excess Lead in a Roadside Pioneer Species Sonchus Oleraceus L.** *Environmental Pollution* 97(3): 275 279.

Yoon J.M., B.T. Oh, C.L. Just, J.L. Schnoor. 2002. **Uptake and leaching of octahydro-1,3,5,7 tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine by hybrid poplar trees.** *Environ Sci Technol*, 36:4649-4655.

Zhang Q, L.C. Davis y L.E. Erick. 2000. **Heavy Metal.** In: **Hazardous Substance Res.** 2 (4):1