



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

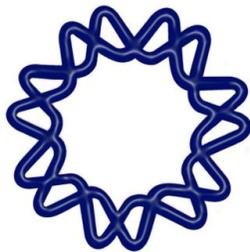
Bioacumulación de níquel en raíces de plantas
completas y en raíces pilosas de la especie
hiperacumuladora *Alyssum lesbiacum*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

RAMCES DE JESÚS GARCÍA



DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSEPH DUBROVSKY

CUERNAVACA, MOR. 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

OF.PMDCB.IBT.234.2011

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Dirección General de Administración Escolar, UNAM
PRESENTE

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del día 8 de junio del 2011 el Subcomité Académico acordó nombrar el siguiente jurado para Examen de Maestría en Ciencias del **BIÓL. DE JESÚS GARCÍA RAMCES**, con **No.de cuenta 96094264** con la tesis titulada, " **BIOACUMULACIÓN DE NÍQUEL EN RAÍCES DE PLANTA COMPLETA Y EN RAÍCES PILOSAS DE LA ESPECIE HIPERACUMULADORA *Alyssum lesbiacum***", dirigida por el Dr. Joseph Dubrovsky.

PRESIDENTE	Dr.	Rafael Vázquez Duhalt
SECRETARIO	Dra.	Katy Juárez López
VOCAL	Dr.	Jorge Luis Folch Mallo
VOCAL	Dra.	Claudia A.Ponce de León Hill
VOCAL	M.en C.	María del Carmen Quinto Hernández

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor; a 24 de octubre 2011
COORDINADOR DEL PROGRAMA

DR. ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA
C.c.p.



Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Biotecnología.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca que me otorgó para realizar la maestría.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), por la beca que me otorgó para elaborar y concluir la tesis.

A la Unidad de Docencia del Instituto de Biotecnología.

Al Dr. Joseph Dubrovsky, una gran persona y un ejemplo a seguir, por todo su apoyo y paciencia con los cuales he logrado terminar este trabajo. Gracias por todas sus enseñanzas, no sólo académicas sino también personales.

A la Dra. Ma. Aurora Armienta Hernández y al Dr. Luis Cárdenas Torres por todos sus comentarios y sugerencias sobre el proyecto de tesis durante los tutorales, y por haber apoyado en mi formación académica.

A la Dra. Katy Juárez López, a la M. en C. María del Carmen Quinto Hernández, a la Dra. Claudia A. Ponce de León Hill, al Dr. Rafael Vázquez Duhalt y al Dr. Jorge Luis Folch Mallol por haber aceptado ser parte de mi jurado de examen para la obtención del grado, por darse el tiempo y tener la paciencia de revisar este trabajo, por todos sus comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar el mismo.

A la Dra. Claudia A. Ponce de León Hill y al M. en C. Manuel Hernández Quiroz de la Unidad de Análisis Ambiental (UNAAMB), Facultad de Ciencias, UNAM., por toda su ayuda, atención y apoyo técnico durante el análisis de las muestras.

Al Dr. José de Jesús Arellano García, la Dra. Yamel Sonia Ugartechea, a la Dra. Svetlana Shishkova y a la M. en C. Selene Napsucialy por todo su apoyo en el laboratorio y sus valiosas aportaciones.

A la M. en C. Irene Sommer Cervantes por todo su apoyo en el análisis estadístico.

Agradecimientos

A mis padres por todo su apoyo, ustedes son mis superhéroes favoritos, ni siquiera DC o Marvel habrían creado unos tan asombrosos.

A mis hermanos, por todo su apoyo y compañía.

A Jazmín, Selene, Raquel, Héctor, Alfonso, Laura, Yamel, Mayra, Anallely, Alejandra, compañeros y amigos del laboratorio, a quienes debo una estancia grata y alegres momentos compartidos.

A Marco, Rivelino, Raúl, Miguel, Luis, Juande, Rafael, Vadim, a las máquinas (Luis, Gerardo, Fernando), Everardo y Jun, por su amistad, camaradería y todos los momentos compartidos desde que llegué a Cuernavaca.

A todos aquellos que desafortunadamente olvidé mencionar pero que han contribuido a este trabajo, gracias.

La terre nous aimait un peu je me souviens.

René Char

*El mundo que respiro
huele a basura fértil
a memoria de incienso
a nafta y a macdonald*

Mario Benedetti

*Just because something doesn't do what you planned it to do in the first place
doesn't mean it's useless...*

Thomas Alva Edison

¿Y por qué no había yo de llegar hasta el final? Me gusta hacer tabla rasa...

Friedrich Nietzsche

*A mi linda princesita Andrea Marjane,
el día en que llegaste a esta vida
se convirtió en el mejor de la mía...*

Bioacumulación de níquel en raíces de plantas completas y en raíces pilosas de la especie hiperacumuladora *Alyssum lesbiacum*.

Índice de Contenido

Resumen.....	13
1. Introducción.....	14
2. Antecedentes.....	18
2.1. Contaminación por metales pesados.....	18
2.2. Contaminación por metales pesados en México.....	21
2.3. Toxicidad de los metales pesados en las plantas.....	24
2.4. Fitorremediación.....	32
2.5. Hiperacumulación de metales pesados.....	36
2.6. Cultivos de raíces pilosas (hairy roots).....	43
2.7. El cultivo <i>in vitro</i> de raíces pilosas como un modelo de estudio de rizoextracción de metales pesados.....	48
3. Hipótesis.....	53
4. Objetivos.....	53
4.1. General.....	53
4.2. Particulares.....	53
5. Metodología.....	54
5.1. Cultivo de plántulas, obtención y establecimiento de cultivo de raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i> y <i>A. montanum</i> para exposición a Ni.....	54
5.1.1. Germinación de semillas de <i>Alyssum</i>	54

5.1.2. Cultivo de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	54
5.1.3. Transformación y establecimiento de cultivos de raíces pilosas.....	55
5.1.3.1. Inducción de raíces pilosas por co-cultivo de explantes.....	55
5.1.3.2. Inducción de raíces pilosas por inoculación en planta completa.....	55
5.1.4. Cultivo de raíces pilosas.....	56
5.1.5. Confirmación de la transformación de los tejidos de raíces pilosas.....	56
5.2. Ensayos para determinar la acumulación de Ni en plantas completas y en cultivos de raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i> y <i>A. montanum</i>	57
5.2.1. Ensayo hidropónico de acumulación de Ni en las plantas completas de <i>Alyssum</i>	57
5.2.2. Ensayo <i>in vitro</i> de acumulación de Ni a largo plazo en los cultivos de raíces pilosas de especies de <i>Alyssum</i>	58
5.3. Ensayo para determinar la acumulación de Ni en cultivos de raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i> a corto plazo.....	59
5.4. Ensayo para determinar la acumulación de Ni en cultivos de raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i> en presencia de otros metales pesados (Mn, Co, Pb).....	59
5.5. Determinación del contenido de Ni, Mn, Co y Pb en las muestras vegetales.....	60
5.5.1. Preparación de las muestras.....	60
5.5.1.1. Ensayos hidropónicos.....	60
5.5.1.2. Ensayos de bioacumulación de Ni en raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i> y <i>A. montanum</i> , así como de bioacumulación de Ni a corto plazo en <i>A. lesbiacum</i>	60
5.5.1.3. Ensayo de acumulación de múltiples metales por raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i>	60
5.5.2. Preparación de las muestras y del Material Certificado de Referencia para su digestión por Horno de Microondas.....	61
5.5.3. Determinación de Ni, Mn, Co y Pb por AAS.....	64
5.6. Análisis Estadístico.....	65

6. Resultados	66
6.1. Establecimiento de cultivos de raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i> y <i>A. montanum</i>	66
6.2. Confirmación de la transformación a través de la detección del gen <i>rol B</i> en raíces pilosas inducidas por <i>A. rhizogenes</i>	67
6.3. Bioacumulación de Ni en plantas completas y en cultivos de raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i> y <i>A. montanum</i>	68
6.3.1. Cultivo hidropónico de <i>A. lesbiacum</i> y <i>A. montanum</i>	68
6.3.2. Cultivos de raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i> y <i>A. montanum</i>	72
6.4. Tasa Relativa de Crecimiento.....	73
6.5. Acumulación de Ni a corto plazo en cultivos de raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i>	75
6.6. Acumulación de Ni, Mn, Co y Pb a corto plazo en cultivos de raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i>	77
7. Discusión.....	82
7.1. Inducción eficiente y establecimiento de cultivos de raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i> y <i>A. montanum</i>	82
7.2. Los cultivos de raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i> mantienen la capacidad de hiperacumular Ni de forma similar a la planta completa de la misma especie.....	83
7.3. Las raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i> pueden absorber e hiperacumular Ni a partir de una solución en un periodo corto de exposición.....	88
7.4. Las raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i> pueden acumular Ni, Mn, Co y Pb a partir de una misma solución.....	90
8. Conclusiones.....	97
9. Referencias.....	99

Índice de Figuras

Fig. 1. Emisión de Ni (compuestos) al ambiente en México durante 2004-2008.....	24
Fig. 2. Mecanismos y complejos ligandos auxiliares en el transporte y el secuestro de iones metálicos	29
Fig. 3. Estrategias de la fitorremediación.....	34
Fig. 4. Las diferentes estrategias de absorción de un metal en relación a su concentración en el suelo.....	37
Fig. 5. Esquema simplificado de la interacción <i>Agrobacterium</i> -planta.....	45
Fig. 6. Estructura del plásmido Ri de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	47
Fig. 7. CEM <i>Mars-X</i> Sistema de Reacción por Microondas.....	63
Fig. 8. Espectrofotómetro de Absorción Atómica PerkinElmer AAnalyst 800.....	65
Fig. 9. Raíces cultivadas por 15 días en medio MS sin hormonas.....	67
Fig. 10. Detección por PCR del gen <i>rol B</i> en DNA de raíces pilosas inducidas por <i>A. rhizogenes</i>	68
Fig. 11. Plantas cultivadas en sistemas hidropónicos en una solución con $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ durante 14 d.....	69
Fig. 12. Acumulación de Ni en la parte aérea de <i>A. lesbiacum</i> y <i>A. montanum</i> cultivados en medio adicionado con Ni durante 14 d.....	71
Fig. 13. Acumulación de Ni en las raíces de <i>A. lesbiacum</i> y <i>A. montanum</i> expuestos durante 14 d.....	71
Fig. 14. Acumulación de Ni en los cultivos de raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i> y <i>A. montanum</i> expuestos durante 14 d.....	72
Fig. 15. Tasa relativa de crecimiento (TRC) de cultivos de raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i> y <i>A. montanum</i> (basada en peso fresco) expuestos a Ni en el medio durante 14 d.....	74
Fig. 16. Recuperación de Ni a corto plazo en raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i>	77
Fig. 17. Acumulación de Ni, Mn, Co y Pb a corto plazo, durante 48 h, en cultivos de raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i>	79
Fig. 18. Porcentajes de recuperación de Ni, Mn, Co y Pb a corto plazo, durante 48 h, en cultivos de raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i>	81

Índice de Tablas

Tabla 1. Genes y agentes ligantes involucrados en el transporte y detoxificación de metales pesados.....	30
Tabla 2. Ventajas y limitaciones de la fitorremediación.....	36
Tabla 3. Familias de plantas hiperacumuladoras y número de plantas hiperacumuladoras descritas para diferentes metales.....	39
Tabla 4. Concentraciones de metales encontradas en especies vegetales no acumuladoras e hiperacumuladoras.....	41
Tabla 5. Cultivos de raíces pilosas empleados en estudios de fitorremediación de diferentes contaminantes ambientales.....	50
Tabla 6. Programa usado para la digestión del material vegetal con microondas.....	64
Tabla 7. Acumulación de Ni a corto plazo en cultivos de raíces pilosas de <i>A. lesbiacum</i> ..	76

Lista de Abreviaturas

AAS	Espectroscopia de Absorción atómica (Atomic Absorption Spectroscopy)
CAT	Catalasa
F-AAS	Espectroscopia de Absorción atómica por Flama (Flame Atomic Absorption Spectroscopy)
GF-AAS	Espectroscopia de Absorción atómica por Horno de Grafito (Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy)
GS	Glutación sintetasa
GSH	Glutación
IRT1	Transportador de Hierro 1 (<i>IRON TRANSPORTER 1</i>)
MnSOD	Superóxido dismutasa dependiente de Mn ²⁺
MT	Metalotioneína
OAS	<i>O</i> -acetil <i>L</i> -serina
PC	Fitoquelatina
PCS	Fitoquelatina sintasa
PS	Peso Seco
POD	Peroxidasa
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxygen Species)
SA	Ácido salicílico
SAT	Serina acetil transferasa
SOD	Superóxido dismutasa
ZIP	Transportador de Zinc (<i>ZINC TRANSPORTER</i>)

Resumen

La industrialización ha generado altos niveles de contaminación en el ambiente a nivel global. Aguas residuales derivadas de actividades industriales contienen metales pesados tales como el Ni, la bioextracción de metales a partir de dichos efluentes permitiría su reciclaje y la mitigación de la contaminación ambiental. Este trabajo de tesis plantea una estrategia de extracción de metales pesados a partir de efluentes, se basa en la generación de cultivos de raíces pilosas de la especie hiperacumuladora de Ni, *Alyssum lesbiacum*, y su uso como un sistema modelo para el estudio *in vitro* de la remoción de Ni. Se establecieron cultivos de raíces pilosas de la especie *A. lesbiacum* y de su congénere no acumulador *Alyssum montanum*, con la finalidad de comparar el potencial de acumulación de Ni entre los cultivos de raíces transformadas y las plantas completas de las mismas especies. Las raíces pilosas de *A. lesbiacum* mantuvieron la propiedad de tolerancia e hiperacumulación de Ni de la planta completa. Las raíces de la planta completa de *A. lesbiacum* acumularon 11220 $\mu\text{g Ni g}^{-1}$ (PS) en sus tejidos, mientras que las raíces pilosas de esta especie acumularon 7100 $\mu\text{g Ni g}^{-1}$ (PS) expuestas a 900 μM de Ni durante 14 d. En presencia de Ni, las raíces pilosas de *A. lesbiacum* mantuvieron una tasa alta de crecimiento, de ~14% al día, por el contrario, las raíces pilosas de *A. montanum* no pudieron mantener su crecimiento y su capacidad de acumulación de Ni fue menor al 10% de lo acumulado por las raíces pilosas de *A. lesbiacum*. Por otro lado, los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* fueron sometidos a diferentes tiempos de exposición a Ni, y ante la presencia en el medio de otros metales (Co, Mn y Pb). Las raíces pilosas acumularon hasta 8540 $\mu\text{g Ni g}^{-1}$, removiendo >80 % del Ni inicialmente presente en el medio en 24 h. La extracción y acumulación de Ni en las raíces pilosas de *A. lesbiacum* se vio afectada por la presencia de otros metales, sugiriendo un efecto antagónico o de competencia entre los metales en los sitios de incorporación a las raíces. Los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* mostraron una alta acumulación de Mn, Co y Pb, con concentraciones máximas de 8450, 3750 y 6680 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente. Estos resultados, tomados en conjunto, muestran que las raíces pilosas de *A. lesbiacum*, pueden extraer Ni a partir del medio y lograr una hiperacumulación en sus tejidos aun en ausencia de la parte aérea. Estas raíces pueden también lograr la hiperacumulación de Co y Pb. Los datos recabados en este trabajo de tesis, permitirían posteriormente elaborar filtros biológicos usando raíces pilosas de especies hiperacumuladoras para remediar aguas contaminadas o bien evitar descargas nuevas de metales pesados a cuerpos no contaminados.

1. Introducción

Metales pesados tales como el Pb, Cd, Cu, Zn, Hg, Cr y Ni son algunos de los principales contaminantes de cuerpos de agua superficial, subterránea, suelos y sedimentos. Existen diferentes cuerpos de agua alrededor de todo el mundo que han sido contaminados con metales pesados a través de diferentes actividades antropogénicas tales como la industria minera, de procesamiento/refinamiento de metales y la electrónica, entre otras. Aguas residuales derivadas de estas actividades contienen metales pesados y aun cuando algunos de estos metales se encuentran en relativamente bajas concentraciones, muchos de los mismos pueden alcanzar niveles considerables de toxicidad cuando se encuentran como componentes de mezclas complejas, aumentando así el potencial de contaminación si las descargas no son tratadas adecuadamente. Como resultado, la remoción de estos contaminantes a partir de estos efluentes industriales se ha convertido en una prioridad, lo cual se ve reflejado en el fortalecimiento y rigidez de las regulaciones ambientales. El tratamiento de las aguas residuales contaminadas con metales pesados es necesario previo a su descarga en el ambiente. Se requieren tecnologías económicamente atractivas para su implementación en la remediación de agua contaminada, así como en el tratamiento de aguas residuales previo a su liberación para minimizar la entrada de contaminantes al medio ambiente. Además de la importancia para la salud humana y el equilibrio ecológico que representa el prevenir o limitar la aparición de metales pesados tales como Ni en las descargas de aguas residuales, estas aguas podrían ser fuentes secundarias de metales pesados de importancia económica. El Ni es un metal importante en la infraestructura moderna y en la tecnología, tiene grandes usos en la industria del acero inoxidable, aleaciones, galvanización, en la industria electrónica y en las baterías recargables. En el ámbito comercial, el precio del Ni está entre los más altos de los metales no-ferrosos.

En términos de protección y remediación ambiental, la biotecnología permite la generación de organismos transgénicos ya sea para la prevención de contaminación o bien, para lograr la remoción de contaminantes de sitios afectados. Este trabajo de tesis está enfocado en un área de la biotecnología basada en el uso de las plantas: la fitorremediación. Las plantas usan mecanismos naturales para tomar elementos minerales a partir del medio, estos cationes o aniones pueden ser transportados y/o acumulados en la parte aérea o bien ser transformados en formas menos tóxicas. Las plantas disponen de

una gran variedad de mecanismos para absorber micronutrientes minerales (por ejemplo algunos metales de transición tales como Cu, Fe, Mn, Zn, Ni), a la par, cuentan con mecanismos como la regulación de transporte, quelación y secuestro para prevenir su toxicidad. El genoma de las plantas codifica para una gran cantidad de familias de transportadores de metales los cuales varían en la especificidad para un sustrato, patrones de expresión, localización celular y compartimentalización para poder regular la absorción, translocación a lo largo de la planta y además mantener una homeostasis iónica, con lo cual pueden sobrevivir en ambientes tanto de deficiencia como de exceso de metales en el medio en que se desarrollan (Arrivault *et al.*, 2006; Palmer y Guerinot, 2009; Puig *et al.*, 2007; Wintz *et al.*, 2003). La fitorremediación es una tecnología emergente basada en las propiedades mencionadas y usa a las plantas para extraer, acumular y remover o generar compuestos menos tóxicos a partir de un ambiente contaminado. Dicha tecnología es altamente prometedora, especialmente para la remoción de contaminantes en cuerpos de suelo y agua donde las concentraciones de los contaminantes son relativamente bajas, lugares donde no es rentable usar métodos físico-químicos tradicionales para su remediación; o por otro lado para prevenir descargas nuevas de contaminantes en sitios no perturbados. Las especies hiperacumuladoras de metales pesados representan una gran opción para su uso e implementación en fitorremediación, cultivos de plantas hiperacumuladoras de Ni del género *Alyssum* ya han sido propuestos y aplicados en actividades de fitorremediación (Salt *et al.*, 1998). Existen diferentes técnicas involucradas en la fitorremediación, cada una involucra diversos mecanismos para la estabilización, contención o remoción de metales pesados del ambiente. Una de las más importantes es la de rizofiltración, en la cual se utilizan las raíces de las plantas para absorber, concentrar y remover metales pesados del medio (Schmoger *et al.*, 2000). Aun cuando especies hiperacumuladoras como *Alyssum lesbiacum*, pueden acumular altos contenidos de Ni en su parte aérea (permitiendo así una cosecha y recuperación del metal), en términos de fitorremediación, este tipo de especies tienen grandes limitaciones: una biomasa pequeña, crecimiento lento, dificultad en la implementación de su cultivo y sobre todo un sistema radical con una biomasa relativamente pequeña. Estas desventajas, en términos reales para la aplicación en campo, implicarían un amplio periodo de tiempo necesario para lograr la remediación efectiva de un medio contaminado. Además, se deben considerar los lineamientos de protección a la biodiversidad de nuestro país, los cuales limitarían y/o excluirían el cultivo de dichas especies hiperacumuladoras por no ser especies autóctonas.

El presente trabajo plantea una estrategia de rizofiltración, implementando por un lado, el uso de especies vegetales hiperacumuladoras de metales pesados y, por el otro, la aplicación de raíces genéticamente transformadas (raíces pilosas), cuya mayor biomasa sería una ventaja aprovechable para fines de fitorremediación. Este trabajo de tesis, propone el uso de cultivos de raíces transformadas (raíces pilosas) de especies hiperacumuladoras como sistemas con gran potencial para su implementación en tecnologías de fitorremediación. El crecimiento característico de estas raíces pilosas permitiría una acumulación de biomasa a un nivel por encima de aquel generado por el crecimiento de una planta completa, influyendo directamente en la cantidad del metal que podría ser removido a partir de un medio acuoso contaminado, así como en el tiempo total en que podría ser lograda la remoción efectiva de dicho contaminante. El uso experimental de estos cultivos de raíces transformadas puede contribuir en la investigación y desarrollo de métodos para la rizofiltración o rizoextracción de metales pesados. Los cultivos de raíces pilosas de especies hiperacumuladoras como un sistema modelo en la captación de metales pesados muestra diferentes ventajas: se pueden propagar fácilmente, muestran una tasa de crecimiento rápido, asociado a una generación significativa de biomasa, tienen una gran estabilidad (genética y bioquímica), presentan una gran ramificación lateral y una gran superficie de área, son sistemas aislados que permiten un análisis sin la interferencia de microorganismos asociados u otros órganos de la planta y además han mostrado buena respuesta en la acumulación de metales pesados, Ni en particular (Boominathan y Doran, 2003; Eapen *et al.*, 2003; Nedelkoska y Doran, 2001). La principal idea de este proyecto, fue generar cultivos de raíces pilosas de una especie hiperacumuladora y analizar las propiedades de estas raíces transformadas ante la exposición a Ni y determinar que tan diferente es su capacidad de bioacumulación con respecto a una planta completa. Para esto, se usó a una de las plantas hiperacumuladoras de Ni más conocidas: *Alyssum lesbiacum*, y a su congénere no acumulador *Alyssum montanum* como punto de control. Los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* fueron también sometidos a periodos cortos de exposición a Ni para saber si era necesario un periodo amplio de exposición al medio contaminado para lograr el mayor porcentaje de recuperación de Ni; además fueron sometidos a la presencia de otros metales tales como el Co, Mn y el Pb adicionados al medio con Ni, a diferentes concentraciones y mezclas de los mismos, a lo largo de un tiempo definido para así saber cómo afecta su presencia la captación de Ni por parte de los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum*. Las raíces pilosas poseen un gran potencial de aplicación en tecnologías de fitorremediación, las cuales podrían usarse para extraer

diferentes metales pesados de efluentes residuales industriales y municipales. La fitominería ofrece la posibilidad de explotar diferentes metales a partir de vetas en desuso, sustratos residuales de actividades mineras, suelos y cuerpos de agua contaminados cuyo beneficio por métodos mineros convencionales no serían económicamente rentables (Boominathan *et al.*, 2004; Brooks y Robinson, 1998; Ernst 2005; Li *et al.*, 2003; Nicks y Chambers, 1995; Robinson *et al.*, 2003; Sheoran *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010). La transformación de diferentes especies hiperacumuladoras de *Alyssum* ha sido realizada por Nedelkoska y Doran (2001); estos autores demostraron que los cultivos de raíces pilosas de *A. bertolonii*, *A. tenium* y *A. troodii* eran tolerantes a la presencia del Ni en el medio y además podían hiperacumularlo. Para un buen aprovechamiento de las especies hiperacumuladoras de metales, es importante estudiar diferentes aspectos de las raíces pilosas en cultivo tales como niveles de tolerancia y capacidad intrínseca de bioacumulación de metales. El análisis del comportamiento de estos cultivos de raíces pilosas de especies hiperacumuladoras, permitirá comprender mejor los mecanismos de interacción raíz-metal, absorción e hiperacumulación, además, en un futuro podrían desarrollarse filtros biológicos basados en los cultivos de estas raíces pilosas para así evitar el flujo y movimiento de este metal pesado en el ambiente. En México, la implementación y uso de cultivos de raíces pilosas de una especie hiperacumuladora como *A. lesbiacum*, ofrece una ventaja adicional. En el desarrollo de estrategias de fitorremediación de cuerpos de agua y suelos contaminados con metales tóxicos, es importante considerar las características climáticas del país. En México las zonas áridas y semiáridas ocupan la mayor parte del territorio, casi un 68%. El uso de cultivos de plantas hiperacumuladoras de metales en estas zonas es realmente difícil, debido a que la mayoría de estas especies son plantas de zonas templadas. El desarrollo de cultivos de raíces pilosas de especies hiperacumuladoras para este tipo de zonas, tendría requerimientos menores en implementación, mantenimiento y aceptación.

2. Antecedentes

2.1. Contaminación por metales pesados.

La industrialización de nuestra sociedad ha generado grandes avances en la misma, pero también ha traído como consecuencia un gran problema de contaminación ambiental alrededor de todo el mundo, poniendo en riesgo ecosistemas de todo tipo. Una de las causas del estado actual de contaminación en nuestro planeta es ocasionado por la dispersión de residuos industriales y urbanos generados por actividades humanas. La disposición inadecuada de estos residuos, derrames accidentales, riego de suelos agrícolas con aguas contaminadas, entre otras actividades, son responsables de la migración de contaminantes a sitios no contaminados mediante procesos de erosión, escurrimiento y/o lixiviación, contribuyendo así a la contaminación del medio ambiente. Refinerías, productoras de papel, fertilizantes, industrias de minería y fundición, fábricas de equipos electrónicos, baterías, entre otras, causan un gran deterioro y contaminación en lagos, ríos y otros cuerpos de agua. En sus procesos, estas industrias pueden generar desperdicios sólidos y líquidos, muchos de ellos contenidos en sus aguas de descarga, mismas que posteriormente pueden ser liberadas sin tratamiento de descontaminación alguno. Aunado a esto, existen descargas a cuerpos de agua provenientes de sistemas municipales que agravan la situación por contaminación con metales pesados.

Existe toda una variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos que causan contaminación, compuestos tales como el Dicloro Difenil Tricloroetano (DDT), bifenilos policlorados, dioxinas, nitrosaminas, compuestos oxidados y reducidos de nitrógeno y azufre, así como diferentes metales pesados, metaloides, causan un gran impacto negativo al medio ambiente (Spellman, 2009). Un componente principal, los contaminantes inorgánicos, está representado por los metales pesados, donde la concentración de metales muchas veces rebasa los límites permisibles de descarga en un efluente (Shannon *et al.*, 2008). La liberación de grandes cantidades de metales pesados al ambiente, por ejemplo cadmio, mercurio, plomo y níquel, entre otros, ha provocado altos niveles de contaminación a nivel global. Gracias a sus características inherentes, así como a la movilidad y biodisponibilidad que pueden presentar, los metales pesados pueden afectar la biósfera por grandes periodos de tiempo, además pueden estar sujetos a procesos de

lixiviación a través de las diferentes capas de suelo provocando la contaminación de cuerpos de agua aledaños o subyacentes. Además, debido a la movilidad, disponibilidad y persistencia que pueden tener en el ambiente pueden generar un gran impacto (Duruibe *et al.*, 2007). El término metal pesado es aplicado a los elementos con una densidad atómica mayor a los 6 g/cm³ (Duffus, 2002), estos elementos se encuentran de forma natural en la corteza terrestre. Cabe mencionar que el impacto total (toxicidad, biodisponibilidad, movilidad, vida media) de muchos metales pesados, no sólo depende de la concentración total, sino que además se debe considerar el fenómeno de especiación (generación de diferentes formas o 'especies' físicas y/o químicas de un elemento), por lo que aun cantidades pequeñas de un contaminante podrían generar un daño significativo. Más aun, si los metales son ingeridos más allá de la concentración permisible, pueden llegar a causar problemas graves de salud. Los métodos tradicionales para el tratamiento de agua contaminadas pueden solucionar diversos problemas, sólo que éstos, al ser implementados pueden generar un impacto extra ya que pueden introducir nuevos contaminantes (generados como un subproducto) en cuerpos de agua, agravando así el problema de contaminación y disponibilidad de agua potable y segura para el consumo humano. La contaminación de agua va en aumento, actualmente se tiene un estimado de 6.5 millones de personas en nuestro planeta, de las cuales alrededor de 1.2 millones carecen de acceso a agua limpia (Naciones Unidas, 2007; Shannon *et al.*, 2008).

Diferentes procesos industriales tales como el electro-plateado, soldadura y producción de aleaciones, usan a lo largo de sus procesos de manufactura diferentes metales de gran importancia económica, uno de ellos es el níquel. Este elemento o compuestos del mismo, pueden ser liberados al ambiente a lo largo de las diferentes etapas de la producción, reciclaje y disposición de los diferentes materiales involucrados en los procesos antes mencionados. Este metal es muy usado en la industria, por ejemplo, en electrodos de baterías recargables Ni-Cd (Níquel-Cadmio), en calculadoras y una gran variedad de dispositivos electrónicos. Cuando este metal se incorpora a un organismo, éste se acumula en los pulmones, riñones, hígado, intestino y el corazón. Una vez en el ambiente, metales pesados como el Ni, pueden ser transportados entre el suelo, el agua, la atmósfera y sus interfaces, creando no sólo un problema de tipo ambiental sino además un riesgo a la salud humana. Por su parte, el uso de combustibles fósiles es también una gran fuente de níquel en el aire, especialmente en zonas urbanas. El níquel y sus compuestos son liberados al ambiente a partir de fuentes de tipo natural (incendios, erupciones volcánicas, procesos de

foto-oxidación, erosión, entre otros). El níquel es un metal pesado, está presente de forma natural en la corteza terrestre, es el 24^º elemento más abundante, puede estar en el suelo y puede también emitirse a partir de erupciones volcánicas. La concentración y disponibilidad del níquel en el suelo y agua varía desde las 1000 partes por millón (ppm = mg kg⁻¹ = mg L⁻¹) hasta las partes por millardo (billón) (ppb = µg kg⁻¹ = µg L⁻¹). Diferentes ecosistemas han mostrado un incremento en la concentración de Ni durante el siglo pasado; Nriagu y Pacyna (1988) dieron un estimado que va entre 24 000 a 87 000 toneladas de emisiones globales a la atmósfera durante el año de 1983. Existen muchos compuestos de níquel que contienen azufre, oxígeno y cloro, muchos de estos compuestos se disuelven fácilmente en agua y generan un color verde muy característico. En la industria, el níquel también es usado en la producción de implementos electrónicos, así como en la fabricación de pilas y baterías. El mal manejo y/o nulo cuidado en el desecho final de todos estos productos puede generar problemas de contaminación ambiental. Tan sólo el uso de baterías en nuestro país, entre 1990 y 2002, provocó la liberación de 22,063 toneladas de níquel al ambiente (Castro y Díaz, 2004). Los residuos generados en la industria pueden liberar níquel al agua y aún cuando no existen estudios detallados al respecto se estima que las cantidades liberadas son altamente significativas. La mayor parte del níquel liberado al ambiente termina en el agua, suelo y en sedimentos, donde se adhiere a partículas minerales. Bajo condiciones ácidas el níquel es mucho más móvil y puede llegar hasta aguas profundas. Existe un tipo de agentes químicos denominados PBT's (Persistentes, Bioacumulativos y Tóxicos), éstos no pueden ser degradados, no son fácilmente metabolizados, pueden acumularse a través de la cadena alimenticia y después de ser incorporados pueden generar un peligro al ambiente y a la salud humana. El níquel está considerado como un agente PBT de alta prioridad (OhioEPA, 2002). Por otro lado, este elemento es considerado como necesario para las plantas y otros organismos, es esencial en diversas enzimas procarióticas tales como deshidrogenasas, hidrogenasas y metilreductasas; la enzima procarionte homotrimérica u homotetramérica contiene dos iones de Ni por subunidad en su centro catalítico (Benini *et al.*, 1999). Entre las plantas puede existir no sólo en el estado de oxidación II, también puede encontrarse en estado I y III, y es requerido como un cofactor para la enzima ureasa y su deficiencia genera síntomas de necrosis (Gerendás *et al.*, 1999; Freyermuth *et al.*, 2000). En altas concentraciones, la formación de complejos y la especiación que puede tener este metal en diferentes sistemas, genera un riesgo latente. El sulfato de níquel, las combinaciones de sulfuros y óxidos de níquel encontrados frecuentemente en las aguas residuales, son los más

peligrosos ya que pueden causar cáncer en los seres humanos (Costa *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2005; Oller *et al.*, 1997).

Existen otros metales pesados tales como Co, Mn y Pb los cuales causan también un gran impacto y deterioro al medio, ya que contaminan los suelos y otros sistemas ambientales. La contaminación antropogénica de ambientes terrestres por Co ha derivado principalmente de la minería y otros procesos industriales, además en la actualidad existen graves problemas de contaminación de mantos subterráneos con el isótopo radioactivo ^{60}Co alrededor de Norte América como resultado de desechar inapropiadamente los residuos de actividades nucleares. El Co, es parte de los contaminantes ambientales más investigados debido a los problemas que puede generar por su persistencia en el ambiente. Este elemento no es muy abundante y en la mayoría de los casos se encuentra entre las 15 y 25 ppm en suelos “típicos”, estas concentraciones se ven altamente superadas en sitios con contaminación antropogénica. El manganeso (Mn) es un metal común en la corteza terrestre y su presencia en los suelos resulta principalmente del material parental edáfico. Las aportaciones más importantes de Mn al ambiente provienen de la industria de manufactura y procesamiento de metales (Aldape *et al.*, 1999; Juárez-Santillán *et al.*, 2010). El plomo (Pb), por su parte posee un gran interés debido a la gran extensión y distribución que presenta, así como el grave impacto que genera no sólo al ambiente sino también a la salud humana. La contaminación por plomo resulta a partir de actividades de minería y refinamiento, por pinturas con un alto contenido del metal, por la manufactura de baterías, combustibles y explosivos, desecho inadecuado de residuos electrónicos, además de las descargas de efluentes residuales de tipo industrial y municipal (Castro y Díaz, 2004; Gavilán *et al.*, 2009; Pacyna y Pacyna, 2001; Román-Moguel, 2007; Seaward *et al.*, 1990).

2.2. Contaminación por metales pesados en México.

Los metales pesados se pueden convertir en contaminantes si su distribución en el ambiente se altera mediante actividades humanas. En general, en nuestro país, esto ha ocurrido durante la extracción y refinamiento de productos mineros (actividades mineras de extracción de oro, plata y cobre, fundición primaria y secundaria de metales), el mal manejo

en diferentes procesos industriales (la galvanización, en la industria de cloro-sosa; en la producción de pinturas, en la industria electrónica y de cómputo), o por la liberación al ambiente de efluentes industriales sin tratamiento de descontaminación previo (el desecho inadecuado de residuos peligrosos en terrenos baldíos, la lixiviación de residuos peligrosos en sitios de desecho y en sitios donde se desarrollan actividades de manejo de residuos peligrosos, la disposición inadecuada de residuos sólidos urbanos) y emisiones vehiculares. Un sector que genera grandes cantidades de residuos con metales pesados es aquel que comprende las pilas o baterías y dispositivos electrónicos. Además, la inadecuada disposición de residuos metálicos también ha ocasionado la contaminación del suelo, agua superficial y subterránea y de ambientes acuáticos.

En nuestro país, a partir de 1960 se registró un estimado de liberación al ambiente aproximadamente de 635 mil toneladas tan sólo de pilas, cuyo contenido incluye metales medianamente tóxicos pero también otros metales de alta toxicidad, esto aunado a los altos volúmenes desechados presentan una gran toxicidad y un gran peligro. Tal es el caso de las 145 918 toneladas de dióxido de manganeso, 1232 toneladas de mercurio (Hg), 22 063 toneladas de níquel, 20 169 toneladas de cadmio (Cd) y 77 toneladas de compuestos de litio (Li). Estas sustancias representan casi el 30% del volumen total de residuos, aproximadamente 189 382 toneladas de materiales tóxicos para el período comprendido tan sólo entre 1960 y 2003 (Castro Díaz y Díaz Arias, 2004). La basura electrónica está compuesta en general de dispositivos electrónicos, de los cuales aquellos provenientes de las computadoras y los dispositivos telefónicos móviles son desproporcionadamente abundantes debido a su corto periodo de vida útil. La basura electrónica contiene metales altamente valuados, tales como Cu y Ni, así como contaminantes ambientales, especialmente Pb, Sb, Mn, Hg, Cd, Co, además de compuestos orgánicos, por ejemplo, difenilos éteres polibrominados (PBDEs) y bifenilos policlorados (PCBs). La quema de esta basura electrónica puede por su parte generar dioxinas, furanos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), hidrocarburos aromáticos polihalogenados (PHAHs) y cloruros de hidrógeno (Román-Moguel, 2007). Tan sólo los “chips” para las computadoras y otros implementos, incorporan sustancias como disolventes volátiles, metil-cloroformo, retardantes de flama y metales pesados de alta toxicidad tóxicos como el berilio, cadmio, plomo y mercurio. Empleando los datos disponibles sobre producción, importación, exportación y consumo, se realizó una estimación de 257 000 toneladas de desechos electrónicos potencialmente disponibles para el año 2006. Con base en los datos sobre

equipos en uso, se obtuvo una proyección de 453 000 toneladas, de residuos para el mismo año. Se encontró, que existe además una cantidad de equipos acumulados (“pasivo electrónico”), que puede ser de dos o tres veces la cantidad antes presentada (Román-Moguel, 2007). Muchos de los sitios contaminados con metales pesados en nuestro país enfrentan una gran problemática tanto en su manejo como en su restauración. De forma general, entre los principales problemas que enfrenta la gestión de la remediación de sitios contaminados en nuestro país podemos identificar de manera principal: a) la falta de recursos financieros para la remediación de sitios contaminados; b) la falta de interés en la recuperación urbana de sitios contaminados; y uno de los más importantes c) la falta de un inventario/diagnóstico completo sobre los sitios contaminados a lo largo de nuestro país. Aun cuando no se tiene un registro completo sobre sitios contaminados en México, en la actualidad, se han reconocido diferentes sitios que presentan distintos metales pesados (Pb, Hg, Cr, Co, Mn, Ni, Cu y Cd) y metaloides (As) los cuales se encuentran por encima de los límites máximos permisibles en la legislación ambiental que rige actualmente. Además, están siendo incorporados por la flora que se encuentra en el sitio contaminado, parte de la cual se usa para consumo humano, (Santos-Santos *et al.*, 2006; Espinosa *et al.*, 2009; Mireles *et al.*, 2004; Franco-Hernández *et al.*, 2010; Juárez-Santillán *et al.*, 2010). Con respecto al níquel, en los últimos años, la cantidad de residuos de este metal pesado emitidos al ambiente a partir de diferentes fuentes antropogénicas, ha aumentado de manera drástica. Tan sólo en el 2008, en total, 1425.42 toneladas fueron emitidas al aire, agua y suelo, de estas, 1003.37 fueron emitidas a cuerpos de agua, sistema que ha sido altamente usado como captor de residuos de Ni donde hasta el 2004 sólo se tenía un registro de emisión de 61.08 toneladas (Fig. 1).

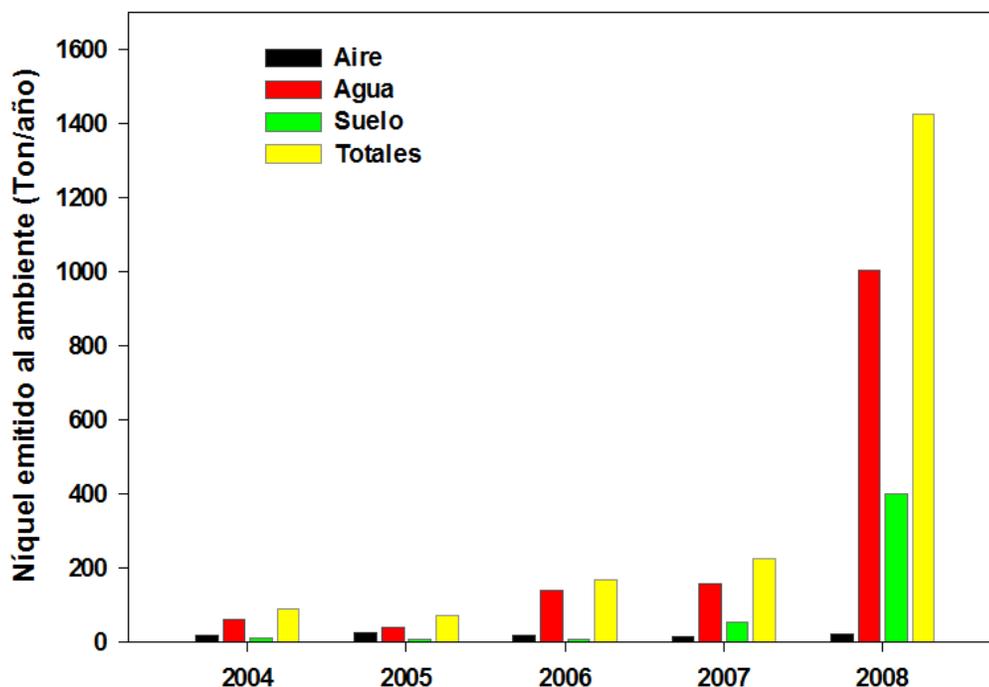


Fig. 1. Emisión de Ni (compuestos) al ambiente en México durante 2004-2008. Basado en datos del Registro de Emisiones y Transferencias de Contaminantes (RETC). México, SEMARNAT. 2010.

2.3. Toxicidad de los metales pesados en las plantas.

Las plantas son organismos autótrofos capaces de utilizar la luz solar y el dióxido de carbono como fuentes de energía y carbono. Como organismos sésiles, han desarrollado diferentes estrategias para obtener minerales y micronutrientes a partir del suelo. Las plantas utilizan su sistema de raíces para incorporar agua y otros nutrientes a partir del suelo y del agua. Este proceso provoca, de manera secundaria, que además absorban una gran variedad de compuestos naturales y sintéticos (compuestos que pueden incluir contaminantes orgánicos e inorgánicos como los metales pesados). Tomando en cuenta lo anterior, las plantas pueden ser consideradas como sistemas de absorción y secuestro para la remediación de ambientes contaminados, lo cual lleva al concepto de fitorremediación. Las plantas ejercen una estrecha regulación sobre sus concentraciones internas de iones metálicos, esta regulación les permite sobrevivir tanto a niveles de deficiencia como a concentraciones altas de iones metálicos presentes en el medio. Diferentes metales y metaloides, los cuales son esenciales para procesos bioquímicos y

celulares, tales como el Zn, Cu, Fe, Mg y Mn, son incorporados a diferentes niveles, éstos pueden ser esenciales para el crecimiento de las plantas, pero a concentración excesiva pueden volverse tóxicos. Otros elementos traza, sin funciones biológicas descritas hasta la fecha, pueden ser incorporados a los tejidos de las plantas e intervenir de manera negativa en procesos celulares, ya sea de manera pasiva o a causa de su similitud con iones esenciales. La fitotoxicidad de los metales pesados puede ser el resultado de alteraciones en diversos procesos fisiológicos causados a nivel celular/molecular mediante la inactivación de enzimas, el bloqueo de grupos funcionales de moléculas con importancia metabólica, el desplazamiento o la sustitución de elementos esenciales y la irrupción de la integridad de la membrana celular. Diferentes metales tales como el Mn, Zn, Fe y el Mo son importantes en la función celular y por lo tanto son considerados micronutrientes esenciales. Los metales intracelulares están disponibles en una reserva citosólica en el rango de concentración micromolar a picomolar. Otros metales tales como el Al, Cd, Pb, Cr, Hg, Ag, Au, y metaloides tales como el As, no participan en funciones celulares y no son considerados esenciales para las plantas. La homeostasis de minerales en las plantas debe ser regulada de forma precisa para poder asegurar la toma suficiente de micronutrientes (Zn, Cu, Fe, Co etc.) hacia los diferentes órganos y además para prevenir concentraciones altas de estos metales así como de otros metales no esenciales (Cd, Pb, Cr, etc.) de inducir efectos deletéreos (Clemens, 2001; Hall, 2002).

En general, la mayoría de los iones metálicos son tóxicos a mayor o menor grado para las plantas, aún a bajas concentraciones y a pesar del hecho de que algunos de estos elementos son considerados como esenciales para su crecimiento y pueden jugar papeles clave en el metabolismo, la mayoría de ellos inducen la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, "Reactive Oxygen Species"), para lo cual se requiere de la síntesis adicional de compuestos antioxidantes y enzimas para su desactivación y/o remoción. Algunos de estos metales, al variar su concentración pueden llegar hasta niveles altamente tóxicos, teniendo como consecuencia la muerte de la planta. Tomando en cuenta las propiedades físicas y químicas, la fitotoxicidad de los metales se da por tres principales razones: 1) interacción directa con las proteínas debido a su afinidad por los grupos carboxilo, tiol e histidil (His); 2) la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, "Reactive Oxygen Species") por auto-oxidación y reacción de Fenton, promoviendo así un estrés oxidativo; y 3) pueden causar el desplazamiento de cationes esenciales de sitios de unión específicos, provocando la falla en la función de las proteínas (Clemens, 2001; Hall, 2002). El

manganeso es un elemento esencial en la mayoría de los organismos, en el caso de las plantas es de particular importancia ya que participa en el metabolismo y en el desarrollo. El Mn es tóxico cuando se presenta en exceso (Marschner, 1995; Paschke *et al.*, 2005). La mayoría de las plantas contienen entre 20 y 500 $\mu\text{g Mn g}^{-1}$ basado en peso seco (PS). En plantas de tipo no acumulador, la toxicidad es aparente cuando la concentración de Mn en las hojas excede los 500 $\mu\text{g Mn g}^{-1}$ PS. (Marschner, 1995). Pero por otro lado, algunas plantas conocidas como hiperacumuladoras de Mn pueden contener hasta 10 000 $\mu\text{g Mn g}^{-1}$ PS, sin mostrar algún tipo de toxicidad, este nivel de tolerancia requiere de sistemas de transporte y detoxificación característicos para estas especies. Aparece en sus estados de oxidación II, III y IV en aproximadamente 35 enzimas de una célula vegetal (Hebbern *et al.*, 2009). El Mn puede ejercer dos funciones en las proteínas: puede servir como un metal catalíticamente activo o bien ejercer un papel de activación en las enzimas. Por ejemplo, un clúster de átomos de Mn es requerido en el centro catalítico en el fotosistema II para la oxidación del agua, por otro lado el Mn también es requerido como un cofactor para la superóxido dismutasa dependiente de Mn^{2+} (MnSOD) (Marschner, 1995). Cuando los niveles de Mn en el medio son muy altos, éste puede ser muy tóxico para el crecimiento de las plantas y existe una gran variedad de mecanismos para evitar dicha toxicidad. Entre estos se encuentran: la conversión del metal a un compuesto metabólicamente inactivo (Mn – agente quelante) o bien el secuestro del ion Mn o el complejo Mn – quelante dentro de un compartimiento como la vacuola. Por otro lado, el níquel, en particular, ha sido denominado como un ‘ultramicro nutriente’, ya que es el centro activo de la ureasa y cofactor de una isoforma de superóxido dismutasa. Sin embargo, en función de la dosis y el tiempo de exposición, un exceso de Ni puede tener efectos tales como: disminución del contenido de clorofila, disminución en las tasas de fotosíntesis y respiración, reducción en la tasa de germinación, disminución en el crecimiento, acompañada de una reducción en la toma de nutrientes, desórdenes en el metabolismo de la planta, así como una reducción en la estabilidad hídrica (Küpper y Kroneck, 2007). Elementos como el Cobalto (Co) están considerados como benéficos para las plantas superiores. La concentración de Co se encuentra de forma normal entre las 0.1 y 10 ppm basado en peso seco. En exceso, el Co inhibe la fotosíntesis, la germinación de semillas y reduce el crecimiento de las plantas (Palit *et al.*, 1994). Existen elementos no esenciales para las plantas que pueden ser parte del sustrato en el que se desarrollan, ya sea de manera natural por procesos pedogénicos donde se liberan dichos elementos a partir de las rocas parentales, o bien por liberación de origen antropogénico. Uno de estos elementos no esenciales para las plantas es el plomo,

las plantas no tienen canales específicos para la toma de este elemento como los tienen para la captación y transporte de otros minerales. Aún cuando algunas especies vegetales toleran la presencia de Pb a través de mecanismos de complejación e inactivación (*Allium cepa*, *H. vulgare* y *Z. mays*), otras especies muestran una gran toxicidad ante su exposición (*Brassica napus* y *Phaseolus vulgaris*); (Huang y Cunningham, 1996; Liu *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2009).

La respuesta de las plantas a metales no esenciales varía dentro de un gran espectro, el cual va desde la tolerancia hasta la toxicidad conforme aumenta la concentración del metal en cuestión. Dado lo anterior, las plantas deben controlar la concentración de estos metales dentro de sus células. Las plantas poseen una gran variedad de mecanismos que les permiten tanto la tolerancia como el balance iónico. Al respecto, existe un grupo relativamente pequeño de plantas que son capaces de secuestrar metales pesados en sus tejidos aéreos y pueden realizarlo a concentraciones muy altas, a estas plantas se les denomina hiperacumuladoras. De forma general, los principales mecanismos involucrados en la hiperacumulación de metales pesados son: a) toma de los metales mediante transportadores de metales en la membrana plasmática; b) detoxificación de los metales y quelación de los mismos en el citoplasma con diferentes ligandos tales como las fitoquelatinas, metalotioneínas y proteínas ligantes de metales; c) secuestro de los metales en la vacuola por transportadores localizados en el tonoplasto (Hall, 2002). El transporte a través de la membrana celular de las raíces es un proceso básico en la absorción de los metales y su movimiento a otros tejidos en la planta. La carga eléctrica, previene que los iones metálicos difundan libremente a través de las membranas celulares hacia el citosol, por esto el transporte iónico hacia las células debe estar mediado por proteínas de membrana que actúen como transportadores. En comparación con otros organismos, las plantas han expandido sus diferentes familias de transportadores involucrados en la toma y transporte de metales, lo cual les permite cumplir con las necesidades minerales de la planta y además mantener una homeostasis correcta. A la fecha, el entendimiento a nivel molecular de la incorporación de iones metálicos a las células vegetales, ha tenido un gran avance. Ya se han identificado y caracterizado un gran número de genes que codifican para transportadores de metales, entre estos podemos encontrar: ATPasas de metales pesados (HMAs - Heavy Metal ATPases), la familia de los facilitadores de difusión de cationes (CDF - Cation Diffusion Facilitator), proteínas tipo ZIPs (ZRT, IRT- like proteins) y los antiportadores de cationes (Weber *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2000)(Fig. 2); ZIP1-4,

ZNT1 (Zinc Transporter), IRT1 (Iron regulated transporter-like proteins), COPT1 (Copper transporter family), LCT1 (Low-affinity cation transporter) localizados en la interfase membrana plasmática – citosol; ZAT (Zn transporter of Arabidopsis thaliana), del tipo ABC (ATP-binding cassette), AtMRP (Arabidopsis Multidrug Resistance Proteins), HMT1 (Heavy Metal Tolerance factor), CAX2 (Cation exchanger) en las vacuolas; y RAN1 (Responsive to Antagonist1) en los cuerpos de Golgi (Tabla 1) (Clemens, 2001). Ya dentro de las células vegetales, existe un mecanismo por el cual las plantas pueden lograr la detoxificación de un metal pesado, éste consiste en la quelación de estos iones metálicos por ligandos. Los agentes quelantes contribuyen a la detoxificación mediante el amortiguamiento de las concentraciones metálicas en el citosol. En las plantas, las principales clases de agentes quelantes de metales incluyen a las fitoquelatinas (ligandos donadores de péptidos, oxígeno y nitrógeno), las metalotioneínas (ligandos donadores de azufre), los ácidos orgánicos (ligandos donadores de oxígeno) y los amino ácidos (ligandos donadores de oxígeno y nitrógeno). En el caso de los ácidos orgánicos, estos contribuyen a la tolerancia, transporte y acumulación de metales pesados tales como el Cd, Zn y Ni. El citrato, malato y el oxalato han sido implicados en una gran variedad de procesos, incluyendo tolerancia a metales, transporte de los metales a través del xilema, así como el secuestro de los metales en la vacuola (Fig. 2).

El Ni puede formar complejos con ácido cítrico, málico y malónico. Salt *et al.* (2002), han sugerido que Ni puede ser transportado al tallo ya sea en forma de un complejo metal-ácido orgánico o bien como un catión hidratado. Ya en el tallo, el Ni puede ser acumulado en la vacuola, en donde la formación de complejos con ácidos orgánicos se ve favorecida por un valor bajo de pH <6. Un ejemplo de amino ácidos como agentes quelantes está dado por la histidina y su habilidad para formar complejos con el níquel. Diferentes especies del género *Alyssum* (Brassicaceae) tienen una capacidad notable para hiperacumular Ni, y esta capacidad se encuentra ligada a su producción de histidina libre (Krämer *et al.*, 1996). La exposición a Ni tiene como resultado un incremento en la concentración de histidina en la savia del xilema en la planta hiperacumuladora de Ni *Alyssum lesbiacum*. Tal respuesta es inexistente en su contraparte no hiperacumuladora *Alyssum montanum*. Además, mediante un análisis de estructura fina por absorción de rayos X, se demostró la formación de un complejo coordinado entre Ni e histidina en la savia de *A. lesbiacum*. Por su parte, plantas completas de *A. montanum* son capaces de transportar mucho más Ni hacia el tallo cuando se les adicionan concentraciones equimolares de histidina exógena. Kerkeb y Krämer

(2003), analizaron el papel de la histidina libre en la carga del xilema de *Alyssum lesbiacum* y *Brassica juncea*, y observaron que los contenidos constitutivos de histidina en las raíces de *A. lesbiacum* eran 4.4 veces más altos que en *B. juncea*. Con lo anterior, podemos ver que la hiperacumulación de Ni está basada en gran parte en la translocación de este metal desde la raíz hacia el tallo y que esta es dependiente de histidina. En otra especie hiperacumuladora de Ni, *Thlaspi goesingense*, se ha demostrado que hay una mayor concentración de histidina en sus raíces en comparación con la planta no hiperacumuladora

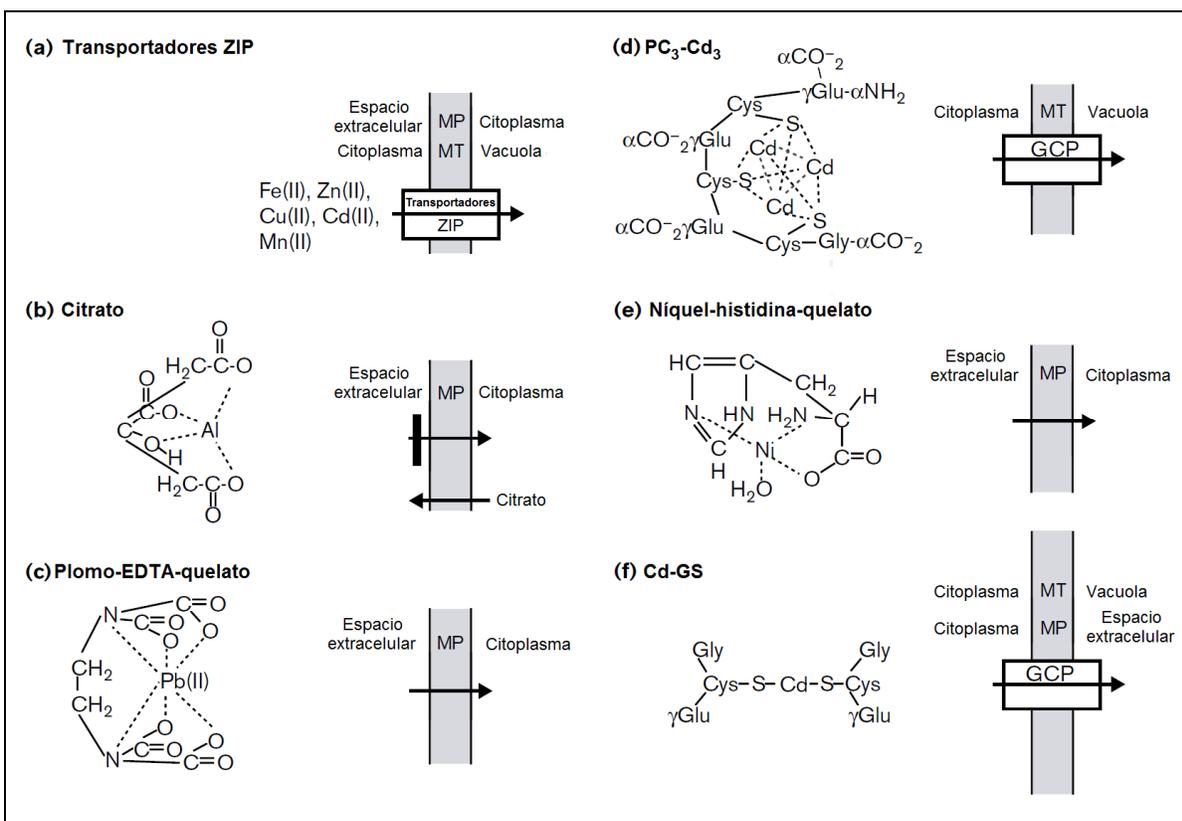


Fig. 2. Mecanismos y complejos ligandos auxiliares en el transporte y el secuestro de iones metálicos. **(a)** Las familias de transportadores ZIP pueden acarrear iones metálicos a través de la membrana plasmática (MP) hacia las raíces y/o a través de la membrana tonoplástica (MT) hacia las vacuolas. **(b)** El citrato secretado puede formar complejos tetraédricos con iones metálicos, bloqueando su transporte hacia las raíces. **(c)** El EDTA puede formar complejos hexaédricos con iones metálicos, promoviendo su incorporación en las raíces y posterior translocación a lo largo de la planta. Otros ácidos orgánicos secretados por la planta usan el mismo mecanismo para adquirir nutrientes a partir del suelo. **(d)** Las fitoquelatinas, en este caso una de tipo trimérico PC₃, pueden formar complejos tetraédricos con metales afines a grupos tioles, permitiendo así su transporte y secuestro en las vacuolas mediante la formación de complejos con glutatión. **(e)** La histidina (His) participa formando complejos tetraédricos con Ni (II) fomentando su incorporación, transporte, tolerancia e hiperacumulación. **(f)** Glutatión puede formar complejos con iones metálicos y posteriormente movilizarlos a través de la bomba de conjugado-S-glutatión (GCP) hacia las vacuolas o fuera de las raíces. Modificado de Meagher, 2000.

T. arvense. Salt *et al.* (1999) identificaron complejos de Zn-His en las raíces de la planta hiperacumuladora de Zn, *Thlaspi caerulescens*. El papel que desempeñan los niveles altos de His, dentro de la hiperacumulación de Ni, ha sido demostrado en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, las cuales expresan la enzima ATP fosforibosil transferasa de *Salmonella typhimurium* (StHisG). Esta enzima es insensible a la inhibición por retroalimentación por la histidina. Estas plantas transgénicas acumularon niveles más altos de histidina (alrededor de dos veces) que las plantas de tipo silvestre y mostraron más de 10 veces de incremento en la biomasa en presencia de Ni en el medio de cultivo (Wycisk *et al.*, 2004). Las plantas también pueden sintetizar otros metabolitos derivados de amino ácidos, tales como betaínas, ácido muginéico y nicotiamina como resultado a la exposición a metales pesados (Sharma y Dietz, 2006).

Tabla 1. Genes y agentes ligantes involucrados en el transporte y detoxificación de metales pesados.

Genes / ligandos	Mecanismos	Referencias
Histidina, Nicotianamina	Quelación de Ni	Krämer <i>et al.</i> , 2007.
<i>CDF</i>	Compartimentalización de Ni, Mn y Zn	Krämer <i>et al.</i> , 2007.
<i>NAS</i> , <i>TcNAS4</i>	Quelación de Ni y Zn	Krämer <i>et al.</i> , 2007; Kaminska <i>et al.</i> , 2008.
<i>ZIPs</i> , <i>IRTs</i>	Toma de Mn, Zn y Cd	Hassinen <i>et al.</i> , 2007.
<i>PCS</i>	Quelación de Cd, As y Hg	Bleeker <i>et al.</i> , 2006; Arnetoli <i>et al.</i> , 2008; Tennstedt <i>et al.</i> , 2009.
ATPasas	Compartimentalización de Cd, Cu y Zn	Cohu y Pilon 2007; Krämer <i>et al.</i> , 2007.
<i>HMA5</i>	Carga de Cu en el xilema	Krämer <i>et al.</i> , 2007.
Metalotioneínas	Quelación de Cu	Guo <i>et al.</i> , 2009.

Existe además una familia de péptidos ricos en cisteína, que son importantes en la detoxificación ya que actúan como agentes quelantes rápidamente inducidos por metales pesados: las fitoquelatinas (PCs). Las fitoquelatinas tienen una estructura general $(\gamma\text{-Glu Cys})_n\text{-Gly}$ donde $n= 2\text{-}11$, la formación de PCs involucra a la glutatión, homoglutatión, hidroximetil-glutatión o γ -glutamilcisteína. Su formación es catalizada por la fitoquelatina sintasa (PCS), también conocida como γ -glutamil cisteína dipeptidil transpeptidasa, una enzima constitutiva que requiere de una activación post-traducciona por metales pesados y/o metaloides, en particular Cd, Ag, Pb, Cu, Hg, Zn, Sn, As y Au. El gran significado funcional de las PCs puede ser atribuido a la presencia de un grupo tiol (-SH), responsable de la formación de complejos con los metales. Los complejos PC-metal, son frecuentemente secuestrados en las vacuolas. Las PCs son importantes para la detoxificación de metales tales como el Cd, Cu y As, mientras que metales tales como Zn y Ni son pobres inductores de las PCs y muestran una baja capacidad de unión. Los complejos metal-PC de bajo peso molecular, son posteriormente transportados a la vacuola donde se forman complejos de alto peso molecular con la incorporación de S^{2-} . Las PCs consisten de sólo tres amino ácidos: glutamina (Glu), cisteína (Cys) y glicina (Gly); están estructuralmente relacionadas al tripéptido glutatión (GSH). Se ha demostrado que las mutantes de *Arabidopsis* deficientes en GSH son también deficientes en PCs y sensibles a Cd (Cobbett *et al.*, 1998). La actividad de la PC-sintasa, dependiente de GSH, fue identificada por primera vez en células en cultivo de *Silene cucubalis* (Grill *et al.*, 1989). Freeman *et al.*, (2004) reportaron las concentraciones de glutatión, Cys y O-acetil-L-serina (OAS) en el tallo y observaron una gran correlación con la capacidad de hiperacumulación en diferentes especies de *Thlaspi*. Altas concentraciones de GSH en la hiperacumuladora *Thlaspi goesingense* se relacionan con una actividad alta constitutiva de la serina acetil transferasa (SAT); la SAT cataliza la acetilación de L-Ser a OAS el cual a su vez provee el esqueleto de carbono para la biosíntesis de Cys. Niveles altos de GSH en *T. goesingense*, además de permitir la hiperacumulación de Ni, también le permiten resistir los daños a causa de estrés oxidativo. Como se mencionó con anterioridad, además de las fitoquelatinas, existen otros péptidos ricos en cisteína que también unen metales, las metalotioneínas (MTs). Las metalotioneínas son proteínas ricas en cisteína y de bajo peso molecular; se han reportado más de 50 MTs en diferentes plantas y se clasifican en cuatro clases (Cobbett y Goldsbrough, 2002). La formación de complejos entre estos diferentes agentes ligantes y los metales, resulta en una disminución en la actividad de los iones libres y por ende la reducción de la toxicidad. Muchos de estos complejos pueden ser

compartimentalizados en vacuolas, permanecer adheridos a paredes celulares o bien localizarse en el apoplasto evitando así su flujo.

2.4. Fitorremediación.

Cuando se supera un límite de contaminación, deben tomarse distintas medidas para poder remediar o restaurar el sitio afectado. Para restaurar un sitio contaminado existen diferentes tecnologías que ya han probado ser eficientes, pero se caracterizan por tener un alto costo, requerir de un gran equipo y presentar dificultades de aplicación *in situ*. Entre los métodos comúnmente usados para la remoción de metales pesados a partir de efluentes podemos encontrar: precipitación química, ultrafiltración, ósmosis reversa, extracción líquido-líquido, resinas de intercambio, entre otras. La precipitación química es una de las técnicas más usadas, pero ésta no es eficiente cuando se aplica a efluentes con una concentración relativamente baja de metales pesados. En estos casos son necesarios tratamientos subsecuentes para poder lograr las especificaciones y requisitos legales de descarga (Kurniawan *et al.*, 2006). Se requiere de tecnologías alternativas, eficientes y económicamente atractivas para restaurar sitios contaminados y/o prevenir la afectación de otros. Además de las tecnologías fisicoquímicas para hacer frente a sustancias contaminantes, existen otras que involucran organismos vivos tales como las plantas o microorganismos. La biorremediación ha sido definida como la eliminación, atenuación o transformación de sustancias tóxicas o contaminantes mediante el uso de procesos biológicos. La biorremediación usa a los microorganismos para remover o detoxificar contaminantes, puede ocurrir *in situ* o *ex situ*. En la actualidad, la biorremediación está principalmente enfocada a los procesos microbiológicos que conllevan al rompimiento y degradación de contaminantes orgánicos así como la detoxificación de complejos con metales pesados. Los microorganismos pueden cambiar el estado de oxidación de diferentes metales, por ejemplo diferentes bacterias y hongos tienen la capacidad de oxidar Mn soluble, es decir Mn (II), a formas insolubles por ejemplo óxidos de Mn (IV); algunos otros microorganismos aerobios y anaerobios son capaces de reducir Cr⁶⁺ (Cheung y Gu, 2007; Hennebel *et al.*, 2008). La mayoría de estas tecnologías requiere la provisión de condiciones ambientales ideales para el crecimiento y desempeño de los microorganismos

en cuestión. Sin embargo, los microorganismos introducidos, son usualmente desplazados por otros microorganismos nativos en el suelo, por lo que muchas veces es necesario el uso de un bioreactor. Por otro lado, los organismos introducidos pueden ser patogénicos para las plantas o bien, producir agentes tóxicos, lo cual limita su uso. Un tipo de biorremediación es la fitorremediación, la fitorremediación usa a las plantas para remover diversos contaminantes de suelos y cuerpos de agua (Singh *et al.*, 2003). Aun cuando la remoción o detoxificación de contaminantes a través de microorganismos (biorremediación) o a través de plantas (fitorremediación) son consideradas tecnologías independientes, es importante considerar todas las interacciones que ocurren y pueden darse entre las plantas y los microorganismos, las cuales pueden ser aprovechadas para en términos de remediación (Kuiper *et al.*, 2004).

En años recientes, la fitorremediación ha emergido como una tecnología sostenible y rentable, ha captado la atención no sólo en el ámbito científico sino también en el comercial. Las plantas tienen la posibilidad de secuestrar diferentes metales pesados en sus raíces, tallos u hojas. La fitorremediación ofrece la posibilidad de extraer, concentrar, volatilizar o inmovilizar diferentes contaminantes, así como controlar la erosión y la infiltración. La fitorremediación comprende diferentes procesos: 1) la fitoextracción remueve metales pesados o contaminantes orgánicos del suelo acumulándolos en la biomasa de la planta, 2) la fitodegradación o fitotransformación usa a las plantas para permitir la degradación de contaminantes orgánicos (Fig. 3), y 3) la rizofiltración, esta permite la remoción de contaminantes de medios acuosos por las raíces de las plantas a través de adsorción y/o absorción. Las plantas a ser usadas en rizofiltración requieren una gran superficie de área en sus raíces. La rizofiltración ya ha sido usada para la descontaminación de aguas con metales pesados tales como el Pb, Cd, Cu, Fe, Ni y Cr (Dushenkov *et al.*, 1995; Salt *et al.*, 1998). En muchos proyectos de remediación, el empleo de cobertura con especies vegetales, ocurre en la fase final del proceso de restauración, después de un tratamiento inicial para reducir los altos niveles de contaminación. Cuando la concentración de los elementos metálicos es relativamente baja, la fitorremediación puede ser, por sí sola, la estrategia económica y funcional más efectiva para ser usada, la cual también puede brindar una solución confiable a largo plazo. Por otro lado, muchos de los sitios contaminados con metales pesados, se encuentran también contaminados con compuestos orgánicos (muchos de ellos de tipo recalcitrante), las plantas pueden lograr la mineralización de dichas sustancias hasta componentes de menor o nula toxicidad

(fitodegradación o fitotransformación). El objetivo principal de estas tecnologías es la descontaminación de suelos y aguas en los cuales existe un nivel bajo/moderado de diferentes contaminantes. En estos casos, las técnicas tradicionales de remediación (excavación, relleno, bombeo y tratamiento de agua) son altamente costosas. La fitorremediación es una alternativa rentable pero su aplicación está limitada por el nivel de contaminación y la naturaleza del contaminante. La fitoextracción es una técnica de la fitorremediación en donde la planta remueve a los contaminantes de suelos, sedimentos o agua. Aquí es necesario contar con una especie caracterizada por generar una gran cantidad de biomasa, así como poder hiperacumular un metal. Los tejidos vegetales cosechados pueden ser posteriormente tratados mediante compactación, confinamiento, incineración, pirólisis o extracción líquida. El éxito de esta técnica requiere que el sistema contaminado, al final de la remediación, cumpla con las regulaciones ambientales. Además, desde un punto de vista económico, debe ser logrado de manera óptima a un bajo costo en comparación con una tecnología alterna o en comparación con el costo provocado por la falta de tratamiento al sistema contaminado (Robinson *et al.*, 2003).

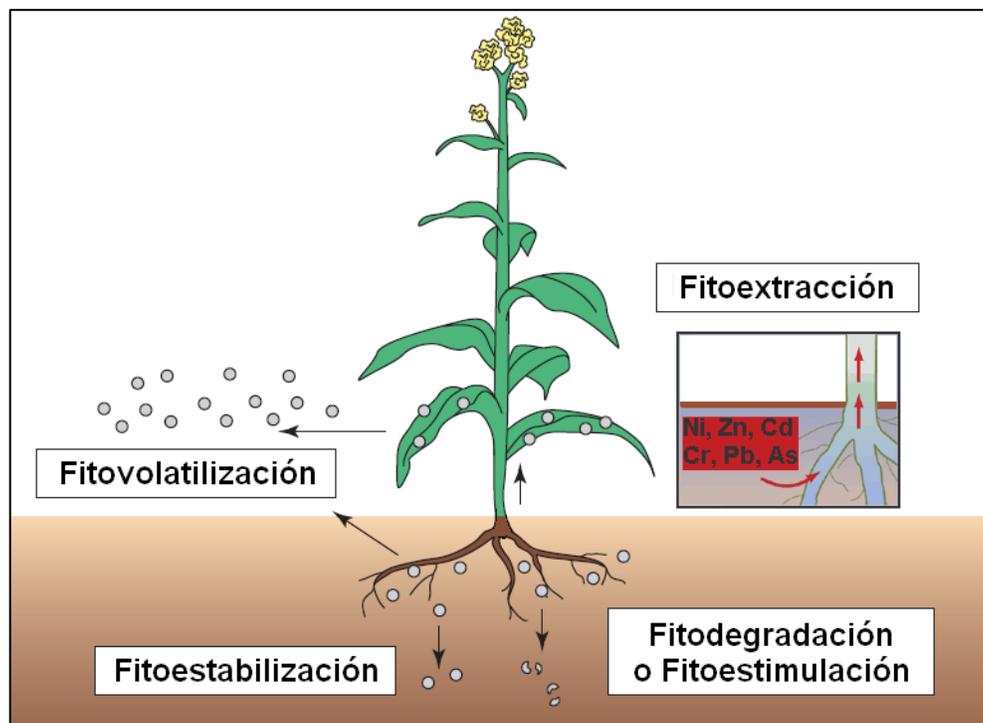


Fig. 3. Estrategias de la fitorremediación (modificado de Pilon-Smits y Pilon, 2000).

La fitorremediación se fundamenta en el hecho de que algunas plantas han desarrollado la habilidad no sólo de sobrevivir en suelos con un gran contenido de metales pesados, sino que además pueden secuestrar y almacenar altas cantidades de éstos en sus tejidos. Diversas especies ya han sido identificadas con propósitos de uso en fitorremediación, algunas plantas de este tipo son referidas como hiperacumuladoras. Chaney en 1983 propuso a la fitorremediación como una tecnología plausible económicamente, para su uso en la remediación y restauración ambiental. Baker y Brooks, (1998), sugirieron la posibilidad de generar cultivos de plantas hiperacumuladoras que pudieran captar metales pesados y translocarlos a la parte aérea, así al final del cultivo, se podría recuperar el metal en cuestión con fines económicos, a esto se le denominó “fitominería”. Aún cuando el principio en la fitorremediación o la fitominería es el mismo, la finalidad para la cual son usados es diferente. La fitorremediación involucra el remover los metales a partir de diferentes medios, suelo o agua, por razones meramente ambientales; mientras que la fitominería a su vez, implica la extracción de los metales a partir de medios ricos en metal usando especies hiperacumuladoras con fines económicos. Al igual que muchas otras tecnologías usadas en la restauración de sitios contaminados, la fitorremediación, además de ventajas muestra algunos inconvenientes (Tabla 2). La fitorremediación, en general, está aún limitada por el gran lapso de tiempo que se requiere para lograr una descontaminación satisfactoria, el número limitado de metales que pueden ser extraídos y la distancia y espacio al que pueden penetrar las raíces, así como la dificultad de producir un cultivo con una alta cantidad de biomasa necesaria para hacer una tecnología rentable y eficiente. Una de las desventajas para la aplicación de la fitorremediación es que muchos metales pesados a altas concentraciones o en determinadas mezclas, pueden causar un deterioro significativo en el crecimiento de la planta y por ende en la producción de biomasa. Además de una gran biomasa, las plantas a ser usadas deben generar un gran sistema radicular y deben de tolerar y/o acumular un gran rango de metales pesados en la parte aérea. Es necesario llevar a cabo nuevas implementaciones, desde un aumento en la comprensión de los mecanismos de absorción que contribuyen en la hiperacumulación de metales y metaloides, así como la complementación de la técnica haciendo uso de herramientas como la biotecnología.

Tabla 2. Ventajas y limitaciones de la fitorremediación (Eapen *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2003).

Ventajas	Limitaciones
Puede ser aplicado <i>in situ</i> .	Restringida a lugares de baja o moderada contaminación.
Aplicable a una gran variedad de contaminantes orgánicos e inorgánicos.	Limitada por la solubilidad y disponibilidad del contaminante.
Los costos de aplicación son menores que los métodos convencionales de remediación.	Las plantas comúnmente usadas tienen un crecimiento lento y generan poca biomasa.
Es fácil de implementar y mantener, no requiere de equipo costoso o personal altamente especializado.	La biomasa usada para la fitoextracción requiere de un apropiado manejo como un residuo peligroso.
Es una tecnología ambientalmente amigable, no destructiva.	Requiere de un período largo de tiempo.
Los sub-productos generados en su implementación son menores que en las tecnologías convencionales.	Los contaminantes pueden ser transferidos a otro medio, el medio ambiente y/o a la cadena alimenticia.
Las plantas son sistemas autotróficos que requieren sólo una pequeña entrada de nutrientes.	La introducción de especies exóticas puede afectar la biodiversidad.
Las plantas previenen la dispersión de los contaminantes a través del agua y la erosión del suelo.	Dependiente del clima y estado del tiempo.

2.5. Hiperacumulación de metales pesados.

Las plantas tienen la capacidad de hacer frente a una gran variedad de condiciones abióticas para así poder colonizar diferentes lugares. Una de estas condiciones adversas puede ser la presencia de metales pesados a altas concentraciones. Las plantas pueden contener a los metales principalmente en las raíces y en el tallo, o bien pueden acumularlos y almacenarlos en una forma no tóxica para su posterior distribución. El mecanismo de tolerancia y/o acumulación en algunas plantas involucra el atrapar metales potencialmente

tóxicos en las paredes celulares o bien almacenarlos en la vacuola. Se puede clasificar a las plantas en cuatro grupos (Fig. 4): a) las especies excluseras, estas plantas previenen la transferencia de metales pesados hacia sus partes aéreas, sin importar cuales sean las concentraciones del metal en el sustrato, pueden contener grandes cantidades de metales en sus raíces; b) las especies indicadoras, la concentración que tienen en sus tejidos aéreos refleja el contenido del metal en el medio; c) las especies acumuladoras, estas plantas pueden concentrar metales en sus tejidos aéreos a niveles por encima de los presentes en el suelo o a un nivel por encima de las especies no acumuladoras, pero pueden presentar signos de fitotoxicidad e inhibición en el crecimiento; y por último, d) las especies hiperacumuladoras, estas especies son acumuladoras muy particulares que muestran una elevada concentración de un metal en sus partes aéreas principalmente como resultado de una efectiva translocación raíz-tallo, sin presentar una inhibición en su crecimiento (Baker y Walker, 1990; Jabeen *et al.*, 2009; McGrath *et al.*, 1999).

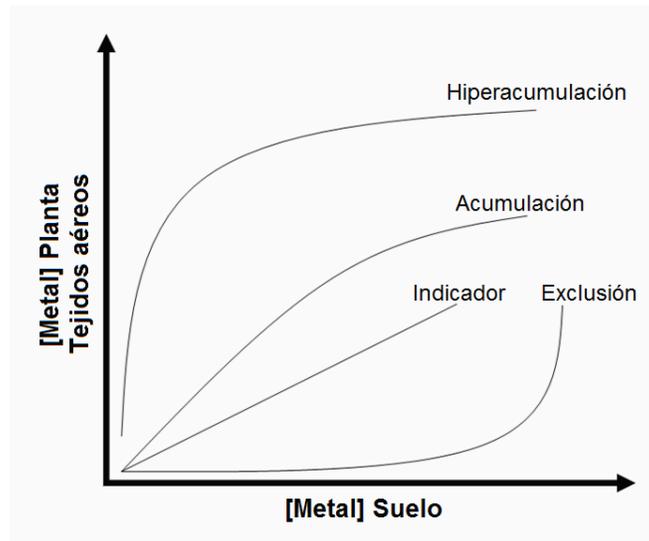


Fig. 4. Las diferentes estrategias de absorción de un metal en relación a su concentración en el suelo. Modificado de Callahan *et al.*, 2006.

Las especies no acumuladoras retienen metales principalmente en las paredes celulares de sus raíces y en las vacuolas, esto con la finalidad de minimizar la fitotoxicidad provocada por los metales pesados. Por otro lado, existe un número de especies de plantas que han

colonizado exitosamente suelos metalíferos, estas especies se han adaptado a la presencia de los metales a gran concentración. Estas son especies acumuladoras que muestran elevadas concentraciones de metal en sus partes aéreas como resultado de un proceso óptimo de incorporación y transporte raíz-tallo-hojas. La hiperacumulación es una sub-clase de resistencia a metales, se caracteriza por permitir la acumulación de altas concentraciones de metales o metaloides en los tejidos aéreos. Las especies no acumuladoras al estar expuestas a altos niveles de metales pesados, concentran a los metales en sus raíces. En una especie hiperacumuladora, las concentraciones de metales pesados en tejidos aéreos son mayores que en las raíces. Las plantas hiperacumuladoras están restringidas a suelos metalíferos con la excepción de plantas que hiperacumulan arsénico (Meharg, 2002). Las especies hiperacumuladoras extraen de manera eficiente diferentes metales a partir de suelos metalíferos y posteriormente los transportan a los tejidos aéreos. En situaciones de aplicación en campo, después de un periodo de crecimiento estas especies hiperacumuladoras de metales pesados pueden ser cosechadas y deshidratadas, la biomasa resultante puede ser reducida a cenizas ya sea aprovechando energía en el proceso o no y posteriormente recuperar los metales en cuestión. Esta “fitominería” comprende la remoción de los metales *in situ* de diferentes sustratos contaminados con la ventaja económica extra de poder recuperar dichos metales de las plantas (Brooks y Robinson, 1998). La hiperacumulación de metales pesados fue observada por primera vez por Minguzzi y Vergano en 1948 en especies del género *Alyssum*. Dichos autores dieron la primer descripción de acumulación de metales en plantas al reportar una alta concentración de Ni, la cual alcanzaba hasta el 1% del peso seco en los tallos de la especie *Alyssum bertolonii* Desv., creciendo en suelos serpentinos. El término “hiperacumulador” fue usado por primera vez por Brooks *et al.*, (1977) para definir a las plantas que tenían una concentración de Ni superior a los $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ basada en peso seco (PS). Este valor no fue elegido de manera arbitraria. Dicho elemento es un micronutriente de las plantas y se encuentra de manera general en órganos vegetativos en un rango de concentración entre los $1\text{-}10 \mu\text{g g}^{-1}$ PS., y es tóxico a concentraciones por arriba de $10\text{-}50 \mu\text{g g}^{-1}$ de PS. Cabe mencionar que los escrutinios iniciales mostraron muy pocas plantas que contenían entre 300 y $1000 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ de PS, sugiriendo una clara distinción entre las especies no acumuladoras y aquellas hiperacumuladoras con el punto límite de $1000 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ como un criterio aceptable para definir el particular fenómeno de la hiperacumulación de Ni (Brooks *et al.*, 1977). Tiempo después de encontrar especies en el rango de concentración de $100\text{-}3000 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ sobre suelos de tipo serpentino, Reeves

(1992) sugirió: un hiperacumulador de Ni es una planta en la cual existe una concentración de por lo menos $1000 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ (o mg kg^{-1}) basado en peso seco de cualquier parte aérea en por lo menos un ejemplar creciendo en su hábitat natural. La definición moderna de hiperacumulador contempla una concentración de más de 1000 mg kg^{-1} (0.1%) del metal en los tejidos de la planta, es decir, un orden de magnitud más alto que las concentraciones de Ni encontradas en plantas “comunes”. En la actualidad se han identificado alrededor de 450 especies de plantas hiperacumuladoras (Montargès-Pelletier *et al.*, 2008). Esta cantidad representa $<0.2\%$ de todas las angiospermas, dichas especies han sido identificadas en por lo menos 45 familias, entre las que destacan: Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Poaceae, Fabaceae, y nuevas especies o poblaciones siguen siendo identificadas (Tabla 3) (Krämer, 2003). La familia Brassicaceae, tiene 87

Tabla 3. Familias de plantas hiperacumuladoras y número de plantas hiperacumuladoras descritas para diferentes metales (Baker et al., 2000; Reeves y Baker, 2000; Reeves, 2003).

Metal	Límite inferior de hiperacumulación (mg kg^{-1})	No. de especies hiperacumuladoras	Familias
Cadmio	100	2	<i>Brassicaceae, Asteraceae</i>
Zinc	10 000	16	<i>Brassicaceae, Crassulaceae, Leguminosae</i>
Manganeso	10 000	11	<i>Apocynaceae, Cunoniaceae, Proteaceae</i>
Cobalto	1000	30	<i>Lamiaceae, Scrophulariaceae</i>
Níquel	1000	320	<i>Brassicaceae, Cunoniaceae, Flacortiaceae, Violaceae, Euphorbiaceae</i>
Cobre	1000	34	<i>Cyperaceae, Lamiaceae, Brassicaceae, Poacea, Scrupulariaceae,</i>
Plomo	1000	14	<i>Compositae, Brassicaceae</i>

especies clasificadas como hiperacumuladoras de metales. La hiperacumulación de metales ha sido descrita para toda una variedad de especies vegetales y para distintos metales pesados (Cd, Co, Mn, Ni, Pb, Sb, Zn) y metaloides (As y Se) (Maestri *et al.*, 2010). Las especies hiperacumuladoras pueden lograr contenidos de metales en tejidos aéreos que sobrepasan el 1% de su peso seco para Zn y Mn, 0.1% para Ni, Co, Cu, Se y As, y 0.01% para Cd (Krämer, 2010). Taxonómicamente hablando, las especies vegetales hiperacumuladoras de Ni son las más numerosas, casi un 75% de todas las especies hiperacumuladoras descritas (Baker *et al.*, 2000; Reeves y Baker, 2000). Resalta el género *Alyssum* (familia Brassicaceae) con 48 especies capaces de acumular Ni en concentraciones que alcanzan el 3% en peso seco de tejidos aéreos, tal es el ejemplo de la especie *Alyssum lesbiacum* T.R.Dudley., (Mengoni *et al.*, 2003; Reeves y Baker, 2000).

Los rangos del contenido de los metales presentes en hojas de plantas normales y de especies hiperacumuladoras son variables (Tabla 4). De forma particular, la hiperacumulación de Ni ($>1000 \mu\text{g g}^{-1}$) ha sido extensamente reportada, alrededor de 318 especies son acumuladoras de Ni, estas especies son denominadas “níquelófilas”. El género *Alyssum* (Brassicaceae) contiene el mayor número de especies hiperacumuladoras de Ni, alrededor de 48 (Seregin y Kozhevnikova, 2006). La mayoría de estas especies se encuentran distribuidas en la zona mediterránea de Europa y en Turquía, son especies endémicas de suelos serpentinos ricos en Ni, por lo que su hábitat es restringido. Las plantas hiperacumuladoras de metales pesados han generado un gran interés para su uso potencial en tecnologías de fitorremediación de suelos y cuerpos de agua. En la última década, los procesos básicos que permiten el mantenimiento de la homeostasis en general y el fenómeno de la hiperacumulación en particular son investigados (Clemens, 2001). A nivel celular, se ha adjudicado un papel principal a la compartimentalización vacuolar del exceso citosólico de metales pesados. Por otro lado, se ha visto que la hiperacumulación está relacionada a la habilidad intrínseca de las especies vegetales para transportar grandes cantidades de metales hacia las vacuolas en la parte aérea (Persans *et al.*, 2001). Hasta la fecha, el proceso de hiperacumulación no ha sido del todo explicado y las razones fundamentales del por qué y cómo es que las plantas pueden hiperacumular metales y metaloides, así como las ventajas adaptativas que puede ofrecer la hiperacumulación de un elemento a una planta, permanecen aún en discusión. La hiperacumulación de metales pesados es un fenómeno complejo que involucra diversos pasos tales como: 1) transporte del metal a través de la membrana plasmática de las células de la raíz; 2) carga en el

xilema y translocación; y 3) la detoxificación o el secuestro de los metales. Análisis a nivel transcriptoma de las especies hiperacumuladoras de Cd/Zn *Thlaspi caerulescens* y *Arabidopsis halleri*, muestran que un gran número de genes involucrados tanto en la toma del metal así como en el mantenimiento del equilibrio homeostático, tienen una expresión alta y constitutiva comparados con sus congéneros no acumuladores *Thlaspi arvense* y *Arabidopsis thaliana* (Hammond *et al.*, 2006; Talke *et al.*, 2006). A nivel de transporte de metales, se ha demostrado que HMA4 y HMA2 (ATPasas de tipo P1B) juegan un papel fundamental en la translocación de Zn y Cd desde la raíz al tallo y lo hacen mediante el bombeo de los iones metálicos desde las células del periciclo hacia los vasos del xilema (Hussain *et al.*, 2004; Wong y Cobbett, 2009).

Tabla 4. Concentraciones de metales encontradas en especies vegetales no acumuladoras e hiperacumuladoras (Reeves y Baker, 2000; Baker *et al.*, 2000).

Metal	No acumuladoras (mg kg ⁻¹)	Hiperacumuladoras (mg kg ⁻¹)
Níquel	10	10 000 – 40 000
Zinc	400	10 000 – 50 000
Cobre	25	1000 – 12 500
Cobalto	5	1000 – 10 000
Cromo	5	1000 – 2 500

En el análisis de la doble mutante *hma2* y *hma4*, la acumulación de Cd en el tallo fue prácticamente restringida, mostrando así que las dos HMAs son el principal mecanismo requerido para la translocación del Cd desde la raíz hacia el tallo (Wong y Cobbett, 2009). Además, al inactivar a HMA4 en *Arabidopsis halleri* mediante el uso de RNAi, se reduce drásticamente la acumulación de Zn y Cd en el tallo y se observa un incremento de estos metales en las raíces (Hanikenne *et al.*, 2008). La expresión elevada de HMA4 en *A. halleri* es atribuible a una combinación de secuencias modificadas de regulación en *cis* y la expansión del número de copias del gen. La manipulación de la actividad de HMA4 también

influye en la expresión de los genes de respuesta a deficiencia de Zn en las raíces, mostrando que un incremento en la carga del xilema conlleva a una sobrerregulación de los genes de transporte que están involucrados en el influjo del metal. HMA4 también se ha visto implicado en la tolerancia de las raíces de *A. halleri* a Zn y Cd (Courbot *et al.*, 2007; Willems *et al.*, 2007). La sobreexpresión de *AhHMA4* en *A. thaliana* sensibiliza al tejido del tallo a la exposición a Zn y Cd como resultado del incremento en la translocación desde la raíz hacia el tallo.

Por otro lado, existe evidencia experimental que muestra que un fuerte sistema de defensa antioxidante juega un papel fundamental en la tolerancia a los metales pesados. Entre dicha evidencia, resaltan estudios realizados en tres especies hiperacumuladoras: *Arabidopsis halleri*, *Thlaspi caerulescens* y *Alyssum bertolonii*. Dichas especies muestran una alta capacidad antioxidante en comparación con sus congéneres no acumuladores. Por ejemplo, usando microarreglos de cDNA y comparando la expresión de genes de la planta hiperacumuladora de Zn/Cd *A. halleri* y su congénero no hiperacumulador *A. thaliana*, se mostró que además de los transportadores de metal, las metalotioneínas 2b y 3, APX y MDAR4 de la ruta ascorbato-GSH se expresan a niveles muy elevados en *A. halleri*, además la actividad de APX y las peroxidadas de clase III están también muy elevadas (Chiang *et al.*, 2006). A su vez, mediante el uso de cultivos de raíces pilosas, se demostró que la especie *Thlaspi caerulescens* tiene una actividad de CAT entre 200 y 300 veces más elevada que la planta no hiperacumuladora *Nicotiana tabacum*. También se registró una elevada actividad de SOD y una elevada concentración de GSH en *T. caerulescens*. El crecimiento de las raíces de *N. tabacum* se ve inhibida ante la exposición a Cd, registrándose a la par un incremento en los niveles de H₂O₂, mientras que *T. caerulescens* mantiene niveles mucho más bajos de H₂O₂ (Boominathan y Doran, 2003). En otro estudio, cultivos de raíces pilosas de *Alyssum bertolonii*, una especie hiperacumuladora de Ni, mostraron una alta actividad de CAT elevada aproximadamente 500 veces al compararse con aquella de *N. tabacum*, además la exposición a Ni provocó un incremento significativo en los niveles de H₂O₂ en *N. tabacum* con respecto a la especie hiperacumuladora (Boominathan y Doran, 2002). La capacidad de tolerar e hiperacumular Ni en especies del género *Thlaspi*, parece estar también ligada a su habilidad de generar altas concentraciones de GSH, Cys y *O*-acetil *L*-serina (OAS). Freeman *et al.*, en el 2004 demostraron que las concentraciones elevadas de GSH en *Thlaspi goesingense* eran causadas por una actividad elevada y constitutiva de la serina acetil transferasa (SAT), la

cual provee del esqueleto de C para la biosíntesis de Cys. La sobreproducción de la SAT de *T. goesingense* en la planta no hiperacumuladora *A. thaliana* llevó a la acumulación de OAS, Cys y GSH, permitiendo además un mayor crecimiento y resistencia al estrés oxidativo. Aunado a los altos niveles de GSH, *T. goesingense* posee una actividad alta y constitutiva de GR y CAT. El entendimiento de los mecanismos mediante los cuales las plantas son capaces de acumular o excluir metales tóxicos es fundamental para poder seleccionar especies que pudieran ser usadas con fines de fitorremediación. Se han realizado diferentes trabajos de investigación sobre estas plantas, no sólo para estudiar su uso potencial en la limpieza de sistemas contaminados, sino además para determinar los procesos bioquímicos y genéticos que les permiten llevar a cabo el fenómeno de hiperacumulación.

2.6. Cultivos de raíces pilosas (hairy roots).

Las plantas a ser usadas en fitorremediación, de manera óptima, deben de cumplir con las siguientes características: 1) tolerancia a altos niveles del metal o metales en cuestión, 2) acumular niveles relativamente altos del metal, 3) tener una tasa de crecimiento rápido, 4) generar una gran cantidad de biomasa y 5) tener un gran sistema radical que permita una mayor área de exposición/absorción. En el caso de las especies hiperacumuladoras, la mayoría poseen un alto índice de bioconcentración y un sistema de transporte raíz-tallo eficiente, esto aunado a una gran tolerancia a los metales. Sin embargo, estas plantas son relativamente pequeñas, de crecimiento lento y no producen una gran biomasa que sea significativa para su uso en campo. La capacidad de remediación de estas plantas puede ser mejorada e implementada a través de manipulación genética y diferentes tecnologías de transformación vegetal. Este enfoque biotecnológico abre nuevas posibilidades para la fitorremediación. La absorción de metales depende de la densidad de las raíces así como de la tasa de transferencia en la interface membrana celular-citoplasma y la tasa de transporte desde la raíz al tallo. En el caso del níquel, al igual que otros metales de transición, es absorbido en la raíz mediante transporte activo y pasivo. La absorción varía para cada especie vegetal. El estudio de los mecanismos básicos de la hiperacumulación, por ejemplo: la toma del metal en cuestión, posterior translocación desde la raíz hacia el

tallo y las hojas, así como mecanismos y rangos de tolerancia, permitirá que diferentes tecnologías de fitoextracción sean desarrolladas e implementadas con éxito. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios en fitorremediación han sido realizados con plantas cultivadas en suelo o de forma hidropónica. Recientemente y a medida en que los esfuerzos son dirigidos hacia la investigación, el entendimiento y mejora en el desempeño de las plantas en las tecnologías de remediación, el número de resultados obtenidos con la ayuda de cultivos *in vitro* de células o tejidos está aumentando de forma drástica.

En particular, los cultivos *in vitro* de raíces son de gran interés para estudiar la interacción de un contaminante con este órgano. Este tipo de cultivo de raíces aisladas, permite la caracterización de la toma de un contaminante evitando la interferencia de la translocación a otros tejidos en la planta. La desventaja de estos cultivos *in vitro* de raíces es su tasa relativamente baja de crecimiento, lo cual podría ser un obstáculo al implementar experimentos de laboratorio. El cultivo *in vitro* de raíces transformadas “hairy roots” (raíces pilosas) puede superar dicha desventaja. La infección de un patógeno edáfico *Agrobacterium rhizogenes*, una bacteria Gram-negativa que pertenece a la familia *Rhizobiaceae*, en una planta hospedera puede generar la aparición de raíces adventicias denominadas raíces pilosas (hairy roots). Esta bacteria es atraída a sitios en una planta que presentan heridas y subsecuentemente inducen la formación de dichas raíces adventicias en una amplia gama de especies de plantas. El desarrollo de estas raíces es el resultado de ingeniería genética “natural” en donde una región específica de DNA bacteriano contenido en el plásmido *Ri* (*root inducing*) de *Agrobacterium rhizogenes* es transferido de la célula procarionte a la célula vegetal, este fragmento de DNA se integra al genoma de la célula vegetal y se expresa (Fig. 5). Este DNA lleva información para la síntesis de enzimas relacionadas con la producción y/o sensibilidad de reguladores de crecimiento. Estas raíces, por un lado producen sustancias denominadas opinas, las cuales son usadas por *Agrobacterium* como nutriente, por otro lado los cambios producidos por la expresión de los nuevos genes de biosíntesis de fitohormonas promueven el desarrollo de estas raíces adventicias y son responsables de la generación de sus principales características: un crecimiento rápido (en comparación con las raíces no transformadas), un alto grado de ramificaciones laterales, una gran presencia de pelos radicales (gracias a lo cual son denominadas “raíces pilosas”) y la ausencia de gravitropismo. De forma general, cuando una planta tiene una herida, produce compuestos fenólicos simples tales como la acetosiringona que atraen a *Agrobacterium rhizogenes* e inducen a los genes *vir*

localizados en el plásmido de *Agrobacterium rhizogenes* los cuales son responsables de la transferencia de fragmentos de T-DNA del plásmido *Ri* en el genoma de las células vegetales (Nilsson y Olsson, 1997). Este fragmento de DNA transferido (T-DNA) es integrado en el genoma de la planta y expresado. En la mayoría de los casos, el T-DNA

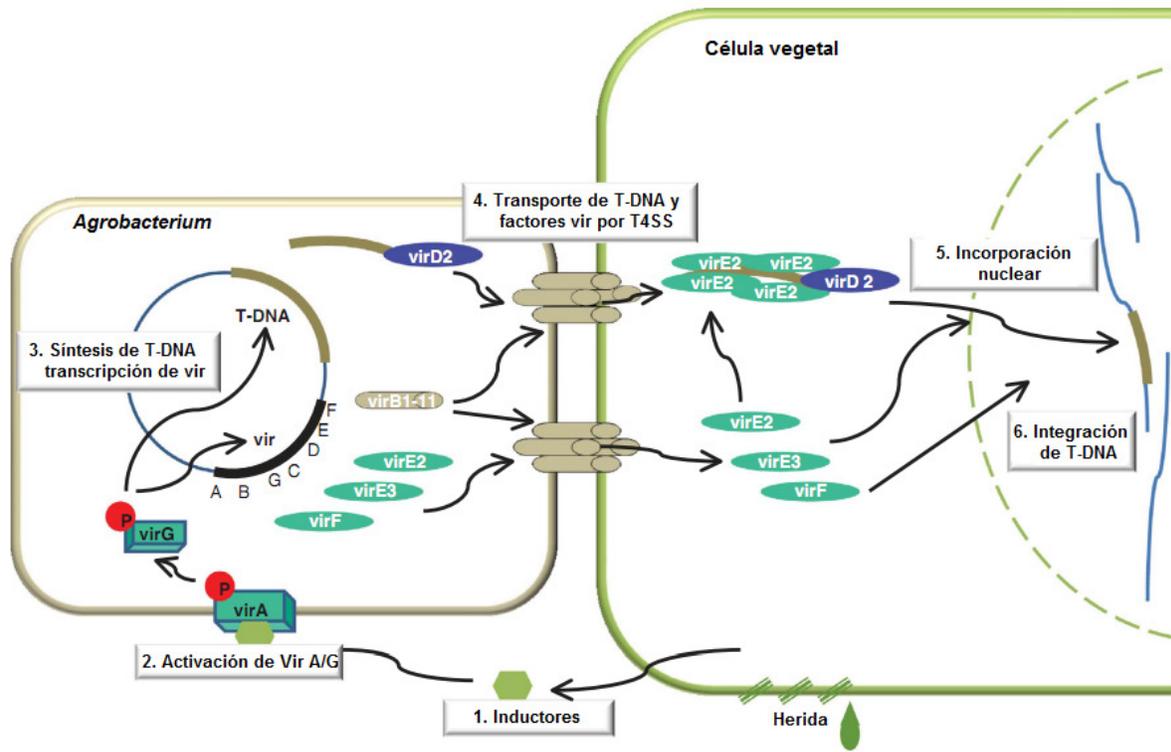


Fig. 5. Esquema simplificado de la interacción *Agrobacterium*-planta. **1.** Señales excretadas por la planta inducen a **2.** La activación del sistema Vir A/G y por lo tanto **3.** La síntesis del T-DNA y la expresión de los genes vir en *Agrobacterium*. **4.** A través de un sistema de secreción tipo IV (T4SS) el T-DNA y las proteínas vir son transferidas hacia la célula vegetal mediante un complejo T-DNA/proteínas Vir. **5.** El complejo de T-DNA es importado en el núcleo de la célula hospedera en donde **6.** El T-DNA se integra al genoma vegetal mediante recombinación. Modificado de Pitzschke y Hirt, 2010.

contiene dos segmentos separados (TL-DNA y TR-DNA) el cual contiene los genes *rol* y los genes *aux*, respectivamente. Los genes *rol* son responsables del fenotipo de raíces pilosas y los genes *aux* dirigen la síntesis de fitohormonas tipo auxinas involucradas en la inducción de las raíces. Como producto de los cambios metabólicos a causa de la expresión de estos genes, se genera el desarrollo de estas raíces adventicias y también

algunas de sus principales características tales como: crecimiento rápido, un alto grado de ramificaciones laterales y una profusión de pelos radicales, gracias a estos últimos, las raíces transformadas son también denominadas “raíces pilosas” (Cardarelli *et al.*, 1987; Shen *et al.*, 1988; Nilsson y Olsson, 1997). La generación de las raíces pilosas involucra la transferencia del T-DNA, loci entre las regiones T_R y T_L del plásmido Ri. En el plásmido Ri el T-DNA es denotado, como ‘left T-DNA’ (T_L-DNA) y ‘right T-DNA’ (T_R-DNA) (Fig. 6). El T_R-DNA contiene genes homólogos a los genes inductores de tumores del plásmido Ti, en esta misma región se localizan los genes que participan en la síntesis de agropinas (Sinkar *et al.*, 1987). Tanto el T_L-DNA como el T_R-DNA son transferidos e integrados de manera independiente al genoma vegetal, la transferencia del T_L-DNA es esencial para la inducción del tejido de raíces pilosas (Nilsson y Olsson, 1997). Si el T-DNA se logra integrar al genoma nuclear de las células de la planta, entonces se codificarán los genes que dirigen la síntesis de auxinas (ácido indole-3-acético) y/o se incrementará la sensibilidad de las células transformadas a las auxinas (McAfee *et al.*, 1993). La producción endógena de auxinas y/o un incremento en la sensibilidad a ellas llevaría a la formación de las raíces pilosas en el sitio de inducción (Shen *et al.*, 1988). El T_R-DNA contiene dos genes: *iaaM* y *iaaH*, los cuales son responsables de la síntesis de auxinas; también contiene los genes responsables de la síntesis de opinas tipo manopina (*mas1*’ y *mas2*’) y tipo agropina (*ags*). Mediante análisis genético por ‘transposon-tagging’ del T-DNA, se han identificado cuatro loci que influyen en la inducción y crecimiento de raíces: *rolA*, *rolB*, *rolC* y *rolD* (White *et al.*, 1985). Posteriormente se demostró que los cuatro loci, genes *rol* (*root oncogenic loci*) correspondían a 4 de 18 marcos de lectura abiertos (ORF’s – Open Reading Frames) identificados en el pRi T_L-DNA: ‘ORF 10’, ‘11’, ‘12’ y ‘15’, estos coinciden con *rolA*, *rolB*, *rolC* y *rolD* respectivamente (Slightom *et al.*, 1986). Los genes *rolA*, *rolB* y *rolC* son suficientes para inducir la formación de raíces en células vegetales transformadas (Cardarelli *et al.*, 1987; Christey 2001).

Las raíces generadas a partir de las plantas transformadas con el T-DNA del pRi, pueden ser cultivadas *in vitro* bajo condiciones estériles de manera muy sencilla. Estos cultivos de raíces pilosas han sido utilizados como modelo de estudio en fisiología vegetal, bioquímica y biología molecular por más de dos décadas debido a su rápido crecimiento, gran ramificación de sus raíces, estabilidad genética y bioquímica, así como por mostrar un patrón metabólico similar al de la planta que les dio origen (Flores *et al.*, 1999; Hu y Du, 2006). Aunado a lo anterior, el cultivo de raíces pilosas permite la propagación indefinida de

las raíces y así acumular grandes cantidades de biomasa, evitando además la variabilidad que puede existir entre individuos de la misma especie. El gen *rolA* juega un papel importante en la formación de raíces pilosas y se ha visto relacionado en cambios en la fisiología hormonal, incluyendo el interferir con giberelinas y poliaminas. Entre los genes *rol*, *rolB* parece ser el más importante en la inducción de raíces pilosas, ya que por sí solo este gen es capaz de inducir raíces (Moriuchi *et al.*, 2004). De manera general, el gen *rolB* tiene un tamaño entre 762 y 837 bp, y codifica una proteína de 259 a 279 aminoácidos (Meyer *et al.*, 2000). *RoIB* codifica una β -glucosidasa, la cual podría liberar auxinas activas mediante la hidrólisis de β -glucósidos inactivos (Estruch *et al.*, 1991). El producto de *rolC* modifica el metabolismo de citocininas mediante

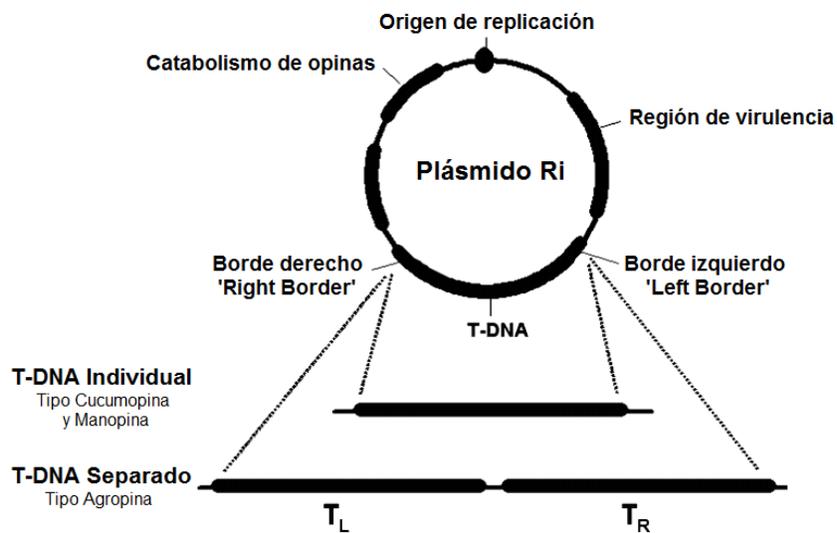


Fig. 6. Estructura del plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes*. Modificado de Veena y Taylor, 2007.

la codificación de una citocinina β -glucosidasa. El efecto de la expresión de *rolC* afecta el balance de formas libres y conjugadas de citocininas así como de auxinas y giberelinas en células vegetales (Nilsson *et al.*, 1993; Estruch *et al.*, 1991b). El gen *rolD* se encuentra únicamente en el T-DNA de las cepas de tipo agropina, codifica para la proteína ornitina ciclodeaminasa que cataliza la conversión de ornitina a prolina. En comparación a otros

genes *rol*, *rolD* muestra una expresión tejido-órgano específico muy pobre, pero parece tener un patrón de expresión predominante en el desarrollo. Los genes *rol* son los responsables de generar las características fenotípicas de las raíces pilosas, tales como una tasa rápida de crecimiento plagiotrópico y una gran ramificación (Veena y Taylor, 2007).

2.7. El cultivo *in vitro* de raíces pilosas como un modelo de estudio de rizoextracción de metales pesados.

Las bases científicas de la fitorremediación son muy importantes para lograr una aplicación exitosa de los diferentes métodos de extracción de contaminantes mediante el uso de plantas. Los sistemas modelo son útiles y necesarios para llevar a cabo estudios básicos de laboratorio antes de tener aplicaciones en condiciones de campo o a escala industrial. La mayor parte de los estudios de fitorremediación se han llevado a cabo usando al organismo completo; dichos estudios proveen información útil relacionada a las capacidades de remoción de la especie en cuestión y además sobre los efectos fitotóxicos de los contaminantes. Sin embargo, en un ambiente contaminado las raíces de las plantas son el primer contacto con los metales pesados y en muchos casos secuestran a los mismos para evitar un desequilibrio homeostático en el resto del organismo. Si el objetivo radica en estudiar la interacción específica de un contaminante dado con las raíces, el uso de sistemas alternativos puede ser de gran ayuda. Los cultivos *in vitro* de raíces no transformadas pueden ser una gran herramienta para estudiar dicha interacción. Este tipo de cultivo de órganos aislados permite analizar la capacidad de absorción de contaminantes por parte de las raíces evitando la interferencia de la translocación de los mismos hacia otros tejidos. Sin embargo, estos cultivos *in vitro* de raíces se caracterizan de manera general por tener una tasa de crecimiento lenta, lo cual puede ser una desventaja. La biotecnología ofrece la posibilidad del cultivo *in vitro* de raíces pilosas lo cual puede evitar dicho problema. Las raíces transformadas (raíces pilosas) son raíces adventicias, que pueden ser un excelente modelo para el estudio de las interacciones contaminante-raíz. Estas raíces pilosas, se generan a partir de la incorporación de T-DNA al genoma de la planta a partir de *Agrobacterium rhizogenes*. Estas raíces transformadas pueden ser

cultivadas bajo condiciones axénicas, además son fácilmente establecidas y propagadas en el laboratorio. Estas raíces transformadas o raíces pilosas, cuentan con una gran profusión de pelos radicales (de aquí la razón de que sean llamadas “raíces pilosas”), son altamente ramificadas (Guillon *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 1991; Shen *et al.*, 1990), cuentan con una gran superficie de área y una capacidad de crecimiento que les permite una generación de biomasa a un nivel más alto que la de la planta completa. Las raíces pilosas representan un modelo experimental biológico sin la interferencia de otras partes de la planta, lo cual facilita el entendimiento y comprensión de los mecanismos fundamentales de absorción, acumulación, distribución, máxima tolerancia y detoxificación de metales pesados. Los cultivos de raíces pilosas han probado ser sistemas *in vitro* para estudios de fitorremediación de una gran variedad de contaminantes orgánicos e inorgánicos. Algunos ejemplos del uso potencial de cultivos de raíces pilosas son enlistados en la Tabla 5. La gran cantidad de ramificaciones que generan, además de la gran superficie de contacto que presentan, muestran a los cultivos de raíces pilosas con un gran potencial de uso en la fitorremediación de suelo y efluentes o cuerpos de agua contaminados.

Los mecanismos fundamentales para la absorción, acumulación, rangos de tolerancia y detoxificación de metales tóxicos por las raíces pilosas, sin la intervención de otros órganos de la planta, están siendo investigados. Tepfer y colaboradores en 1989, fueron los primeros en considerar la aplicación del cultivo de raíces pilosas como un modelo de estudio en la biodisponibilidad y captación de metales pesados, como el cadmio a partir de lodos residuales. La investigación fue retomada por Nedelkoska y Doran (2000), quienes observaron que un cultivo de raíces pilosas de la especie hiperacumuladora *Thlaspi caerulescens*, tenía una alta acumulación de Cd y esta era claramente mayor que en un cultivo de raíces de especies no hiperacumuladoras. Estudios posteriores usando cultivos de *T. caerulescens* mostraron una fuerte inducción de catalasas en respuesta a la exposición a Cd, sugiriendo así que las defensas antioxidantes pueden desempeñar un papel importante en éstas especies para lograr una alta tolerancia a los metales pesados (Boominathan y Doran, 2003). Los cultivos de raíces pilosas ya han sido probados en estudios de bioacumulación de metales pesados, se ha demostrado que los cultivos de raíces pilosas de plantas hiperacumuladoras son capaces de tomar cadmio, níquel y uranio en medios contaminados (Boominathan y Doran, 2003; Eapen *et al.*, 2003).

Tabla 5. Cultivos de raíces pilosas empleados en estudios de fitorremediación de diferentes contaminantes ambientales.

Especies	Contaminante	Referencia
<i>Solanum nigrum</i>	Cadmio	Macek <i>et al.</i> , 1994.
<i>Rubia tinctorum</i>	Cobre	Maitani <i>et al.</i> , 1996.
<i>Thlaspi caerulescens</i>	Cadmio	Nedelkoska y Doran 2000.
<i>Alyssum</i> sp.	Níquel	Nedelkoska y Doran 2001.
<i>Alyssum bertolonii</i> y <i>Nicotiana tabacum</i>	Níquel	Boominathan y Doran 2002.
<i>Brassica juncea</i> y <i>Chenopodium amaranticolor</i>	Uranio	Eapen <i>et al.</i> , 2003.
<i>Solanum nigrum</i>	Bifenil policlorados	Kucerová <i>et al.</i> , 2000.
<i>Brassica napus</i>	2,4-diclorofenol	Agostini <i>et al.</i> , 2003.
<i>Brassica juncea</i> y <i>Cichorium intybus</i>	DDT	Suresh <i>et al.</i> , 2005.
<i>Helianthus annuus</i>	Tetraciclina y oxitetraciclina	Gujarathi <i>et al.</i> , 2005.
<i>Brassica napus</i>	Fenol	Coniglio <i>et al.</i> , 2008.

En el caso de níquel y *Alyssum*, Nedelkoska y Doran en el 2001, usaron cultivos de raíces pilosas de *A. bertolonii*, *A. tenium* y *A. troodii* y demostraron que puede existir una alta capacidad de tolerancia e hiperacumulación de Ni en las raíces de manera independiente al resto de la planta. Las raíces pilosas parecen mantener la habilidad de las raíces no transformadas para absorber, acumular, tolerar y/o detoxificar metales pesados. Posteriormente a la demostración de que los cultivos de raíces pilosas de *A. bertolonii* pueden hiperacumular Ni en ausencia del tallo o las hojas, los cultivos de pilosas de especies hiperacumuladoras han sido usados como sistemas modelo para la generación de productos derivados de procesos de fitorremediación; dichos productos finalizan

enriquecidos con el metal en cuestión. Después de una exposición a Ni en medio líquido que presentó una acumulación de hasta 1.9-7.7 % de Ni basado en peso seco. La incineración de tejidos de raíces pilosas, generó un subproducto conteniendo hasta un 82 % de Ni (Boominathan *et al.*, 2004). Lo anterior muestra el potencial de uso de cultivos de raíces pilosas para fines de fitorremediación.

Existen otras ventajas que permiten usar cultivos de raíces pilosas en estos estudios, estos son por ejemplo el uso de un ambiente estéril libre de microorganismos que podrían interferir, así como la similitud bioquímica de los cultivos de raíces pilosas con las raíces sin transformar de la especie en cuestión. En este trabajo de tesis, se plantea usar a la especie hiperacumuladora de Ni *Alyssum lesbiacum*, especie capaz de absorber grandes cantidades de Ni y lograr su transporte hacia la parte aérea bajo diferentes condiciones experimentales (Krämer *et al.*, 1996; Kerkeb y Krämer, 2003). Esta especie ha sido ampliamente estudiada, ha mostrado una gran tolerancia a niveles tóxicos de Ni en el suelo, además de una gran capacidad de translocación, transporte y acumulación de altos contenidos del metal en la parte aérea. Estas propiedades son totalmente benéficas en términos de fitorremediación porque puede tolerar y acumular altos contenidos de Ni, sin embargo, se caracteriza por generar muy poca biomasa, tener un crecimiento lento, desarrollar un sistema radical con una biomasa relativamente pequeña y además, no es fácilmente cultivable. Por lo tanto, en este trabajo de tesis se propone usar cultivos de raíces transformadas (raíces pilosas) generadas a partir de la especie hiperacumuladora *A. lesbiacum*, cuyo crecimiento permitiría acumular una biomasa a un nivel mucho mayor que el de la planta completa. Los cultivos de raíces pilosas, son de interés particular en el estudio de la interacción entre los contaminantes y la raíz, la cual en la mayor parte de los casos es el primer punto de contacto con el contaminante en cuestión. El objetivo final en este trabajo de tesis, es utilizar cultivos *in vitro* de raíces pilosas, generados a partir de una especie hiperacumuladora de Ni, como un sistema modelo en la investigación de fitorremediación, en particular estudiando la remoción de este metal pesado a partir de soluciones acuosas. El uso de cultivos de raíces pilosas de una especie hiperacumuladora en estudios de bioabsorción/bioacumulación, generaría un respaldo científico para su aplicación en la filtración y/o biorremediación de aguas residuales contaminadas, así como la prevención de contaminación en agua, sedimentos y suelos. La investigación se enfoca en la absorción de Ni a partir de una solución acuosa y su posterior secuestro en los tejidos de las raíces transformadas. El objetivo de este trabajo consiste por un lado, en evaluar la

capacidad de los cultivos de raíces transformadas de la especie *A. lesbiacum* para bioacumular Ni y comparar su capacidad de acumulación del metal con respecto a las raíces no transformadas de la planta completa de la misma especie, por otro lado, evaluar y caracterizar la capacidad de toma de dicho elemento por parte de la raíz sin la interferencia de la translocación del metal a tejidos aéreos a diferentes tiempos exposición; y por último evaluar la participación de otros elementos tóxicos que usualmente acompañan al Ni en condiciones reales de contaminación como son el Mn, Co y Pb, en el proceso total de rizoextracción de Ni a partir de un medio acuoso contaminado, todo bajo condiciones controladas de laboratorio. Se propone así una estrategia de extracción de metales pesados a partir de aguas residuales (de tipo industrial y municipal) basada en el cultivo de raíces pilosas. El avance y continuidad en la investigación sobre la interacción planta-metal, proveerá de nuevas herramientas aplicables en tecnologías integrales de fitorremediación. La bioextracción de metales a partir de efluentes contaminados, además de evitar y/o mitigar la contaminación del ambiente, permitiría el reciclaje, ya que la biomasa generada en un sistema de extracción de Ni de un medio contaminado, podría ser usada para recuperar y reintroducir el metal en distintas actividades económicas (Boominathan *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2006).

3. Hipótesis

Los cultivos de raíces pilosas de la especie hiperacumuladora de Ni *Alyssum lesbiacum*, mantendrán una capacidad de acumular el metal de forma similar a la planta completa de la misma especie.

4. Objetivos

4.1. General

Establecer cultivos de raíces pilosas de la especie hiperacumuladora *Alyssum lesbiacum*, determinar su capacidad de acumulación de Ni y compararla con la capacidad de las plantas completas, además analizar la acumulación de Ni en las raíces pilosas de *A. lesbiacum* en periodos cortos de exposición y ante la presencia de otros metales pesados en el medio.

4.2. Particulares

- a) Comparar la capacidad de acumulación de Ni entre raíces pilosas de la especie hiperacumuladora *A. lesbiacum* y las plantas completas de la misma especie, a diferentes concentraciones del metal y bajo un periodo de exposición largo (2 semanas).
- b) Determinar la capacidad de acumulación de Ni de las raíces pilosas de *A. lesbiacum* en periodos cortos de exposición (1-24 h).
- c) Analizar la capacidad de acumulación de Ni de las raíces pilosas de *A. lesbiacum* ante la presencia de otros metales pesados (Mn, Co y Pb) en el medio, a diferentes concentraciones y bajo diferentes combinaciones.

5. Metodología

Para este estudio se usaron dos especies del género *Alyssum* con diferentes capacidades de bioacumulación de Ni, es decir, una especie hiperacumuladora, *A. lesbiacum*, y otra especie de baja capacidad de acumulación, *A. montanum*, como control.

5.1. Cultivo de plántulas, obtención y establecimiento de cultivo de raíces pilosas de *A. lesbiacum* y *A. montanum* para exposición a Ni.

5.1.1. Germinación de semillas de *Alyssum*.

Las semillas de *A. lesbiacum* y de *A. montanum* fueron esterilizadas durante 5 minutos con una solución de etanol al 70% (vol/vol), luego con una solución preparada con hipoclorito de sodio 2% y adicionada con Tritón X-100 al 0.08 % durante 5 min., para finalmente ser lavadas 4 veces durante 5 minutos con agua destilada estéril. Las semillas estériles fueron colocadas a 4°C durante 48 h, posteriormente fueron sembradas en cajas Petri con medio MS (Murashige-Skoog) 0.2X, suplementado con 1% de sacarosa y solidificado con 0.8% de agar, las cajas se colocaron en posición vertical en un cuarto de cultivo a una temperatura de 24°C, bajo un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. Aproximadamente 2 semanas después, las plántulas fueron trasplantadas a frascos de vidrio para permitir un mayor crecimiento y realizar así los experimentos de inducción de raíces pilosas.

5.1.2. Cultivo de *Agrobacterium rhizogenes*.

La cepa silvestre A4 de *A. rhizogenes*, fue cultivada en medio YM líquido (manitol 1%, MgSO₄ • 7H₂O 0.8 mM, K₂HPO₄ • 3H₂O 2.2mM, extracto de levadura 0.04 % y NaCl 1.7 mM), conteniendo glicerol 15% (vol/vol) y 50 µg/mL de rifampicina a pH 7.0. El cultivo se mantuvo por 48 h a 28°C en agitación orbital a 120 rpm y se usó para realizar la inducción de las raíces pilosas en explantes de *A. montanum*. Por otro lado, el mismo cultivo fue usado para la inoculación de la planta completa.

5.1.3. Transformación y establecimiento de cultivos de raíces pilosas.

5.1.3.1. Inducción de raíces pilosas por co-cultivo de explantes:

El procedimiento para inducir la formación de raíces pilosas en *A. montanum* incluyó el co-cultivo de explantes, en este caso el co-cultivo de hojas y peciolo con *A. rhizogenes* A4. Los explantes en los cuales fueron realizadas pequeñas incisiones, fueron incubados con 20 ml del cultivo de *A. rhizogenes* en medio YM líquido por 40 min. Después de la incubación, los explantes fueron transferidos a cajas Petri con medio MS 1X y 1% de sacarosa; el co-cultivo permaneció en oscuridad a 22°C durante 48 h y al término de este lapso los explantes fueron lavados con una solución de agua destilada, adicionada con cefotaxima 50 µg/mL. Posteriormente se traspasaron a cajas Petri con medio MS 1X, suplementado con sacarosa 3%, 0.8 % de agar y adicionado con cefotaxima 400 µg/mL para la eliminación de *A. rhizogenes*. Después de aproximadamente 3 semanas, las raíces que aparecieron en los explantes fueron aisladas y cultivadas en cajas Petri con medio MS 1X, 3% sacarosa, 0.8% de agar y 400 µg/mL de cefotaxima. Bajo estas condiciones, se realizaron por lo menos tres cambios posteriores, para así asegurar la eliminación de la bacteria y así evitar falsos positivos al realizar la confirmación de la transformación mediante PCR.

5.1.3.2. Inducción de raíces pilosas por inoculación en planta completa:

En las plantas de *A. montanum* y *A. lesbiacum* cultivadas *in vitro* en frascos de vidrio, se hicieron varias heridas con una hoja de bisturí a lo largo de los tallos para estimular la generación de compuestos fenólicos (producidos por la planta como respuesta a la lesión) y así promover el proceso de infección por *A. rhizogenes*. Posteriormente se inocularon con *A. rhizogenes* los puntos de lesión. Las plantas de *Alyssum* inoculadas con *A. rhizogenes*, permanecieron durante 48 h en medio MS 1X, sacarosa 1% y 0.8% de agar en un cuarto de cultivo a una temperatura de 24°C, bajo un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. Al término de este lapso, las plantas infectadas se cambiaron a frascos con medio MS 1X, con sacarosa 3%, 0.8 % de agar y con 400 µg/mL cefotaxima, durante un lapso de 2-3 semanas. Las raíces que emergieron a partir de los sitios de infección fueron transferidas junto con un fragmento del tejido y cultivadas en cajas Petri con medio MS 1X, sacarosa 3%, 0.8% de agar y cefotaxima 400 µg/mL. Posteriormente se realizaron por lo menos tres

cambios de medio de cultivo en agar adicionado con el antibiótico para asegurar una eliminación efectiva de la bacteria.

5.1.4. Cultivo de raíces pilosas.

Los cultivos obtenidos de raíces de *A. lesbiacum* y *A. montanum* tuvieron por lo menos tres cambios a medio MS fresco con 400 µg/mL cefotaxima, antes de la confirmar su transformación, asegurar que las raíces estaban libres de *Agrobacterium* y verificar que tenían un crecimiento estable. Algunas de las clonas de las raíces pilosas de las dos especies de *Alyssum* que estaban libres de la bacteria, se propagaron en medio líquido a 25°C, bajo condiciones de obscuridad y en un agitador orbital a 100 rpm, en frascos Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio líquido MS 1X suplementado con 3% de sacarosa para su uso posterior en los experimentos de bioacumulación de Ni.

5.1.5. Confirmación de la transformación de los tejidos de raíces pilosas.

Para verificar que ocurrió la inserción del T-DNA de la bacteria al genoma de la planta y por ende la transformación de las raíces, se realizó una prueba por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). El DNA de las raíces pilosas de ambas especies fue extraído mediante un protocolo de extracción con CTAB (Allen *et al.*, 2006), mientras que el DNA de *A. rhizogenes*, cepa silvestre A4, fue extraído y purificado usando un kit de extracción de DNA (Puregene, Gentra systems, Danvers, MN, USA). El PCR fue usado para confirmar la presencia del gen *rol B* en las raíces pilosas obtenidas de *A. lesbiacum* y *A. montanum*. Los oligonucleótidos usados para la detección de un fragmento de 652-bp del gen *rol B* fueron los siguientes: *rolB1* 5'-ACTATAGCAAACCCCTCCTGC-3' y *rolB2* 5'-TTCAGGTTTACTGCAGCAGGC-3' (Bonhomme *et al.*, 2000). La amplificación de DNA se llevó a cabo en un termociclador, usando una mezcla de reacción de 25 µL que consistió en: buffer estándar para PCR, 1.5 µL de *Taq* DNA polimerasa, 25 mM de MgCl₂, 1.5 µL de dNTPs 10 mM, 0.5 µL del oligonucleótido *rolB1* y 0.5 µL del oligonucleótido *rolB2* 100 pmol, 18 µL de H₂O Milli-Q y 1 µL del DNA blanco. Las condiciones de amplificación fueron: 30 ciclos, desnaturalización a 94°C por 1.5 min., alineamiento del primer a 57°C por 1 min., para la amplificación del fragmento del gen *rol B*, y elongación a 72°C por 1 min. Las secuencias de DNA amplificadas fueron detectadas en geles de agarosa 1% (w/v) en buffer TBE 1X y visualizadas bajo luz UV.

5.2. Ensayos para determinar la acumulación de Ni en plantas completas y en cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* y *A. montanum*.

5.2.1. Ensayo hidropónico de acumulación de Ni en las plantas completas de *Alyssum*.

Para determinar la capacidad de bioacumulación de Ni en plantas completas de *A. lesbiacum* y *A. montanum*, se realizaron cultivos hidropónicos. Semillas de las dos especies de *Alyssum* a las que previamente se les esterilizó su superficie, fueron sembradas en cajas Petri con medio MS 0.2X, suplementado con 1% de sacarosa y solidificado con 1% de agar. Las cajas se colocaron en posición vertical a 24°C durante el día y 22°C durante la noche, bajo un fotoperiodo de 16/8 horas de luz-oscuridad. Después de tres semanas posterior a la germinación, plantas uniformes de *A. lesbiacum* y *A. montanum* se seleccionaron y fueron transferidas (las raíces fueron previamente lavadas con agua estéril para remover rastros de sacarosa) a contenedores de vidrio (una planta por contenedor), cada uno conteniendo 450 ml de una solución MS 0.2X, amortiguada a un pH de 5.8-6.0 con 1 mM MES, sin aireación y se mantuvieron así durante 5 días para su aclimatación bajo condiciones de cultivo hidropónico.

Después de 5 días de aclimatación en cultivos hidropónicos con una solución líquida MS 0.2X, la solución fue cambiada, ahora cada contenedor contenía una solución nutritiva modificada de Hoagland al 0.5X ajustada y amortiguada a un pH 5.8 a 6.0 con 1 mM MES, mantenidas sin aireación durante 3 días para su aclimatación. Posteriormente la solución fue cambiada por una solución nutritiva modificada de Hoagland al 0.1X, la cual contenía 11.503 mg/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.286 mg/L H_3BO_3 , 65.64 mg/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.008 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.335 mg/L $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.25 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 24.076 mg/L MgSO_4 , 0.181 mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.0016 mg/L MoO_3 , 60.66 mg/L KNO_3 y 0.022 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, la solución fue ajustada y amortiguada a un pH 5.8 a 6.0 con 1 mM MES. Las plantas de *A. lesbiacum* y *A. montanum* fueron mantenidas bajo estas condiciones durante tres días. Al inicio del tratamiento experimental, la solución fue cambiada por una fresca, pero ahora la solución fue suplementada con una sal de níquel ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a diferentes concentraciones 0, 300, 600 y 900 μM (0, 17, 35 y 52 mg L^{-1}); los cultivos hidropónicos se mantuvieron bajo exposición a la solución con el metal durante un periodo de 14 días (la solución hidropónica fue reemplazada por una nueva al día 7). Los sistemas hidropónicos

fueron mantenidos en un cuarto de cultivo con una luz suplementaria provista por lámparas a una densidad de flujo de fotones de $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante el día, con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, con temperaturas de 24°C y 20°C , día y noche respectivamente. El medio fue aireado continuamente usando bombas de acuario. Las raíces crecieron bajo oscuridad continua (los frascos fueron cubiertos por completo) a lo largo de todo el experimento para así evitar contaminación en la solución nutritiva.

5.2.2. Ensayo *in vitro* de acumulación de Ni a largo plazo en los cultivos de raíces pilosas de especies de *Alyssum*.

Cultivos de raíces pilosas de las dos especies de *Alyssum* que estaban libres de la bacteria, fueron propagadas en medio líquido creciendo a 25°C , bajo condiciones de oscuridad y en un agitador orbital a 100 rpm, en frascos Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio líquido MS 0.5X suplementado con 3% de sacarosa. De estos cultivos, algunas de las clonas de las raíces pilosas de *A. lesbiacum* y *A. montanum* fueron subcultivados en matraces Erlenmeyer con 50 ml de una solución modificada de Hoagland al 0.5X MS, 30 g L^{-1} de sacarosa y mantenidos bajo estas condiciones durante 3 días. Posteriormente, el medio fue sustituido por una solución nutritiva modificada de Hoagland al 0.1X, amortiguada a un pH 5.8 a 6.0 con 1 mM MES y mantenida así durante 3 días para su aclimatación previa al experimento. La acumulación de Ni a largo plazo en los cultivos de raíces pilosas de las dos especies de *Alyssum* fue investigada en experimentos llevados a lo largo de 14 días. Al inicio del experimento la solución fue cambiada por una nueva. El Ni fue adicionado en la forma de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a concentraciones 0, 300, 600 y $900 \mu\text{M}$, a la solución de Hoagland 0.1X, suplementada con 30 g L^{-1} con el pH ajustado a 5.8-6.0 y amortiguada con 1mM MES. Aproximadamente 1 g de peso fresco de raíces pilosas de ambas especies fue cultivado en 50 mL de la solución descrita en matraces Erlenmeyer de 250 mL y mantenido en condiciones de oscuridad a 25°C en un agitador orbital operado a 100 rpm. La solución experimental para cada concentración del metal fue cambiada por una fresca a los 7 días de tratamiento.

5.3. Ensayo para determinar la acumulación de Ni en cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* a corto plazo.

El potencial de acumulación de Ni en periodos cortos de exposición en los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* fue investigado a 1, 6, 12 y 24 h de incubación. El Ni fue adicionado en la forma de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 52 mg L^{-1} (el término de mg L^{-1} se refiere a la concentración del metal en particular) a la solución de Hoagland 0.1X, suplementada con 30 g L^{-1} de sacarosa, con el pH ajustado a 5.8-6.0 y amortiguada con 1 mM MES. Aproximadamente 1 g de peso fresco de cultivo de raíces pilosas de *A. lesbiacum* fue cultivado en 50 mL de la solución descrita en matraces Erlenmeyer de 250 mL y mantenido en condiciones de oscuridad a 25°C en un agitador orbital operado a 100 rpm.

5.4. Ensayo para determinar la acumulación de Ni en cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* en presencia de otros metales pesados (Mn, Co, Pb).

Los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* fueron expuestos a una solución que contenía una mezcla de metales (Ni, Mn, Co y Pb) bajo un periodo de exposición de 48 h. Los metales fueron adicionados a concentraciones iniciales de 52.82 mg L^{-1} ($900 \mu\text{M}$) de Ni^{2+} , 54.94 mg L^{-1} ($1000 \mu\text{M}$) de Mn^{2+} , 35.36 mg L^{-1} ($600 \mu\text{M}$) de Co^{2+} y 20.72 mg L^{-1} ($100 \mu\text{M}$) de Pb^{2+} ; donde el término de mg L^{-1} se refiere a la concentración del metal en particular y no así al compuesto en que fue adicionado. Los metales fueron adicionados como las siguientes sales: $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, MnSO_4 y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, a la solución Hoagland 0.1X, suplementada con 30 g L^{-1} de sacarosa con el pH ajustado a 5.8-6.0 y amortiguado con 1 mM MES. Aproximadamente 1 g de peso fresco de cultivo de raíces pilosas de *A. lesbiacum* fue cultivado en 50 mL de solución de Hoagland en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Las soluciones experimentales contenían uno de los seis tratamientos con metales (Ni, Ni+Mn, Ni+Co, Ni+Pb, Ni+Co+Mn y Ni+Co+Mn+Pb) y fueron cultivados en condiciones de oscuridad a 25°C en un agitador orbital operado a 100 rpm.

5.5. Determinación del contenido de Ni, Mn, Co y Pb en las muestras vegetales.

5.5.1. Preparación de las muestras.

5.5.1.1. Ensayos hidropónicos: Al término del período de exposición a Ni, se registró el peso fresco de todas las muestras. Posteriormente todas las raíces fueron lavadas con agua desionizada durante 2 min y luego con una solución 50 mM de EDTA durante 5 minutos para remover el Ni²⁺ adsorbido a la superficie de las raíces y por último dos nuevos lavados cada uno de 5 min con H₂O MilliQ. La fracción aérea (hojas y tallos) fueron lavadas con agua desionizada durante 2 min, luego lavadas con una solución 50 mM de EDTA durante 2 min y por último dos veces con agua desionizada durante 2 min cada uno. Las muestras obtenidas se secaron en un horno a 65°C hasta alcanzar un peso constante (aproximadamente 72 h) y se registró el peso seco.

5.5.1.2. Ensayos de bioacumulación de Ni en raíces pilosas de *A. lesbiacum* y *A. montanum*, así como de bioacumulación de Ni a corto plazo en *A. lesbiacum*: Al término del periodo de exposición a Ni, el exceso de humedad en las raíces pilosas fue removido usando papel filtro Whatman durante 2 min, luego se registró el peso fresco de todas las muestras. Posteriormente las raíces fueron lavadas primero con agua desionizada durante 2 min, después con una solución de 50 mM de EDTA durante 5 minutos para remover el Ni²⁺ adsorbido a la superficie de las raíces y por último dos nuevos lavados cada uno de 5 min con H₂O MilliQ. Las muestras se secaron en un horno a 65°C hasta alcanzar un peso constante (aproximadamente 72 h) y se registró el peso seco de cada una. En el caso de los cultivos de raíces pilosas expuestos a Ni en periodos cortos, el medio líquido residual fue medido gravimétricamente y se colocó en tubos Falcón de 50 mL, a éstos se les adicionó 30 µL de HNO₃ redestilado (grado ultrapuro) para evitar la precipitación del metal y fueron almacenados a 4°C hasta su posterior análisis por espectroscopia de absorción atómica (AAS, por sus siglas en inglés).

5.5.1.3. Ensayo de acumulación de múltiples metales por raíces pilosas de *A. lesbiacum*: Al término del período de exposición a la solución con las diferentes mezclas de metales, el exceso de humedad en las raíces pilosas fue removido usando papel filtro Whatman durante 2 min, luego se registró el peso fresco de todas las muestras.

Posteriormente todas las muestras de los cultivos de raíces fueron lavadas con agua desionizada durante 2 min y luego dos veces con una solución de 50 mM de EDTA durante 5 minutos cada una para remover metales adsorbidos a la superficie de las raíces y por último dos nuevos lavados cada uno de 5 min con H₂O MilliQ. Las muestras se secaron en un horno a 65°C hasta alcanzar un peso constante (aproximadamente 72 h) y se registró el peso seco de cada una.

5.5.2. Preparación de las muestras y del Material Certificado de Referencia para su digestión por Horno de Microondas.

Las plantas de *A. lesbiacum* y *A. montanum* así como los cultivos de raíces pilosas de ambas especies fueron recolectadas después de 14 días de exposición a una solución nutritiva adicionada con Ni para poder determinar si los cultivos transgénicos de raíces pilosas mantenían la propiedad hiperacumuladora de Ni sin la existencia de las zonas de depósito y acumulación en la parte aérea. Por otro lado los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* fueron expuestos a una concentración de Ni dentro del medio de cultivo a periodos cortos (1, 6, 12 y 24 h) para determinar si era necesaria una exposición prolongada para lograr la mayor acumulación posible del metal. Además, cultivos de raíces pilosas de la especie *A. lesbiacum* fueron expuestos a diferentes concentraciones de otros elementos (Ni, Mn, Co y Pb) y con diferentes combinaciones de los mismos, agregados al medio de cultivo y expuestos durante 48 h. Todos los tejidos de las muestras vegetales usadas en los experimentos de bioabsorción/bioacumulación fueron digeridos y preparados para su dilución y posterior lectura por Espectroscopia de Absorción Atómica para conocer el contenido total de cada uno de los elementos en cuestión. Dependiendo del objetivo analítico se deben tomar en cuenta diferentes factores para poder realizar la digestión de las muestras de interés, por ejemplo: nivel de contaminación, homogeneidad de las muestras, eficiencia de la digestión, reproducibilidad y confiabilidad de la técnica analítica empleada, tiempo requerido para procesar las muestras a analizar, entre otros. Todas estas muestras vegetales consisten de una matriz orgánica (particular para cada tejido), las cuales pueden causar un error analítico, provocando una medición inadecuada del contenido de metales si la muestra no es totalmente descompuesta. Una amplia gama de métodos de digestión para plantas han sido propuestos y publicados, métodos tales como la calcinación húmeda o seca con una mezcla de diferentes reactivos, digestiones abiertas convencionales, disolución por microondas entre otros (Barin *et al.*, 2008; Hseu, 2004;

Lippo *et al.*, 1997; Oliva y Valdés, 2004; Rodushkin *et al.*, 1999; Sastre *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2002). La calcinación húmeda o seca son procedimientos generalmente lentos y se caracterizan por requerir demasiado tiempo. Para este trabajo en particular, se eligió la digestión asistida por microondas ya que ofrece muchas ventajas con respecto al resto de los procedimientos para la mineralización de una muestra vegetal para su análisis metálico.

La digestión por microondas usando ácidos fuertes como oxidantes en sistemas cerrados y presurizados de PTFE (politetrafluoroetileno), sometidos a altas temperaturas, es una alternativa efectiva para la preparación de muestras vegetales. Las soluciones con ácidos minerales pueden absorber con más intensidad la energía de microondas debido a su contenido de agua. En la digestión asistida por microondas se reduce el consumo de ácido así como los niveles de contaminación, en comparación a aquellas digestiones de tipo abierta, por otro lado se tienen mejores porcentajes de efectividad en la digestión y la recuperación de los elementos de interés, además es un método altamente reproducible para una gran variedad de matrices (Araújo *et al.*, 2002; Bocca *et al.*, 2007; Huie, 2002; Krachler *et al.*, 2002; Quevauviller *et al.*, 1993; Soylak *et al.*, 2007; Walas *et al.*, 2004). La oxidación de las muestras se llevó a cabo usando un horno de digestión por microondas (Mars X, CEM) (Fig. 7). Se eligió este tipo de digestión para reducir el riesgo de contaminación y la pérdida de analitos volátiles, consiguiendo así que los metales de interés pasen de la muestra sólida a una solución; además en estas condiciones el punto de ebullición del ácido se eleva cuando la presión dentro de los vasos se incrementa, llevando así a una digestión más rápida y más efectiva a través de toda la matriz orgánica. Usando una mezcla de HNO_3 y H_2O_2 , la mayoría de las muestras biológicas son completamente digeridas. Para cada muestra, se pesaron entre 0.010 y 0.200 g (± 0.05 g) de tejido, que se colocaron en vasos de digestión de Teflón (PTFE) cuidando que toda la porción de la muestra pesada se vertiera correctamente dentro del envase; esto se logró enjuagando los recipientes donde se pesaron las muestras con 1 ml de agua Milli-Q ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). La oxidación se logró añadiendo 4 ml de HNO_3 redistilado (grado ultrapuro) a cada vaso, se agitó durante 15 min, posteriormente se agregó 1 ml de H_2O_2 (grado ultrapuro) y se continuó agitando por 45 minutos (predigestión). Después de la predigestión, se introdujo un carrusel con vasos de teflón en un horno de microondas para su digestión. Cada muestra vegetal puede requerir un programa particular de intensidad y duración de uso de microondas, debido a sus propiedades intrínsecas. Para este caso, todas las muestras fueron rampeadas a 185°C alrededor de 20 min y mantenidas a esta misma temperatura

por 10 min, antes de dejar enfriar la muestra por debajo de los 30°C para abrir los vasos de digestión, de acuerdo al programa mostrado en la Tabla 6. Tanto la presión como la temperatura fueron monitoreadas a través de la digestión para asegurar que los vasos de digestión llegaran a la temperatura crítica de 185°C en donde las muestras eran digeridas.



Fig. 7. CEM Mars-X Sistema de Reacción por Microondas.

Para poder comprobar la precisión del método de digestión usado, se utilizó un material de referencia certificado (SRM 1570a Hojas de Espinaca), una porción de aproximadamente 0.200 g del material estándar fue incluida por cada corrida de digestión. Además de los estándares internos, se usaron controles blancos de reactivos para así asegurar la precisión y exactitud en el análisis de las muestras. Entre cada corrida de digestión, los vasos de PTFE fueron apropiadamente lavados y sumergidos en HNO₃ al 10 % (vol/vol) por lo menos durante 12 h, luego enjuagados con agua bidestilada abundante y agua desionizada antes de su uso para evitar efectos de memoria entre corridas de digestión de muestras. El material digerido fue filtrado (0.22 μm) y llevado de manera gravimétrica a un volumen total de 10 ml usando agua Milli-Q (18MΩ cm⁻¹). La solución resultante fue usada para la determinación de la concentración total de los elementos por AAS (F-AAS y GF-AAS).

Tabla 6. Programa usado para la digestión del material vegetal con microondas.

Paso	Potencia	T (°C)	Tiempo (min)
1	1200 W	150	0
2	1200 W	175	2
3	1200 W	185	10

5.5.3. Determinación de Ni, Mn, Co y Pb por AAS.

Para la determinación de Ni, Co, Mn y Pb se utilizó un espectrómetro de absorción atómica de alto rendimiento PerkinElmer AAnalyst™ 800 (Fig. 8) con el software WinLab32 para AA y un atomizador motorizado automatizado de intercambio que permite un cambio rápido entre AAS por flama y usando el implemento de horno de grafito mediante una simple orden en el software. El instrumento está equipado con un sistema de calentamiento de alto desempeño y controles de gas TotalFlow™ para AAS por flama así como un Horno de Grafito Calentado Transversalmente (Transversely Heated Graphite Furnace – THGA) con un corrector longitudinal de fondo para efecto Zeeman. El uso del THGA provee una distribución de temperatura uniforme a lo largo de toda la longitud del tubo de grafito, esto elimina el efecto de memoria inherente al análisis de las muestras. Se utilizaron lámparas de descarga sin electrodo de alta-energía (High-energy electrodeless discharge lamps – EDLs) Perkin Elmer para la determinación de todos los elementos. Los parámetros de operación para el análisis de Ni, Co, Mn y Pb fueron ajustados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Estándares de calibración uni-elementales para espectroscopia atómica de 1000 mg L⁻¹ fueron usados como estándares stock para preparar los estándares de medición, los cuales fueron preparados mediante diluciones seriales volumen/volumen en contenedores de polipropileno. Todas las muestras fueron analizadas por F-AAS o GF-AAS dependiendo de la concentración de cada elemento para cada muestra, es decir cuando la concentración estaba por debajo del límite de detección de F-AAS se realizaba el cambio a GF-AAS para la determinación correcta de Ni, Co, Mn y Pb. Se realizaron las respectivas diluciones seriales (vol/vol) para cada muestra para poder realizar la lectura de cada elemento usando una curva de calibración con una linealidad

confiable. Se construyeron curvas de calibración de siete puntos (seis estándares y un blanco) para todos los iones metálicos; se aseguró que el coeficiente de correlación de las curvas de calibración para cada ión fuera mejor que 0.999 antes del comienzo de cada análisis de muestras. Para el caso de GF-AAS, los recipientes de automuestreo fueron sumergidos en HNO_3 al 20 % (vol/vol) durante 24 h, luego enjuagados con abundante agua Milli-Q ($18\text{M}\Omega\text{ cm}^{-1}$) antes de su uso para evitar contaminación de las muestras.



Fig. 8. Espectrofotómetro de Absorción Atómica PerkinElmer AAnalyst 800.

5.6. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron expresados como medias aritméticas con errores estándar, realizados con el software Excel 2007 para Windows. Para confirmar la variabilidad de los datos y la validez de los resultados obtenidos, el análisis estadístico de todos los datos fue realizado con el software Statistica (StatSoft, 2008) usando el procedimiento de análisis de varianza (ANOVA), y fueron analizados para diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha = 0.05$) usando una prueba post hoc de tipo Tukey.

6. Resultados

6.1. Establecimiento de cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* y *A. montanum*.

Se obtuvieron raíces pilosas después de la transformación de *A. lesbiacum* y *A. montanum* con la cepa silvestre A4 de *A. rhizogenes*, tanto en la inducción por co-cultivo de explantes para el caso de la especie *A. montanum*, así como en la inoculación de la planta completa para ambas especies. En el caso de la inoculación en las plantas completas, la cepa A4 de *A. rhizogenes* indujo un crecimiento profuso de raíces a partir de las áreas lesionadas dentro de 15 a 25 días posteriores a la inoculación en las plantas cultivadas *in vitro*. Las raíces emergentes fueron aisladas y transferidas junto con un fragmento del tejido y cultivadas en medio MS sólido suplementado con el antibiótico cefotaxima durante por lo menos tres cambios de medio de cultivo para asegurar una efectiva eliminación de la bacteria. Las raíces no transformadas, controles, mostraron un crecimiento pobre al ser cultivadas en medio MS sin hormonas (Fig. 9 (a) y (c)), mientras que las raíces pilosas mostraron un crecimiento activo y estable, con una extensa ramificación (Fig. 9 (b) y (d)).

Para el caso de la inducción por co-cultivo de explantes de *A. montanum*, la formación de raíces pilosas fue observada alrededor de tres semanas posteriores a la inoculación de los explantes obtenidos por la cepa A4 de *A. rhizogenes*. Al igual que en el caso anterior los remanentes de *Agrobacterium* fueron eliminados de los co-cultivos mediante la incubación de los cultivos de raíces pilosas en medio MS suplementados con cefotaxima. Después de cuatro a cinco pasajes por medio con antibiótico, los siguientes cambios de medio se realizaron sin la presencia de dicho antibiótico, se generaron cultivos uniformes de raíces pilosas los cuales crecieron activa y establemente, con una alta incidencia de ramificaciones laterales. Al igual que las raíces pilosas obtenidas mediante la inoculación en las plantas completas, las raíces obtenidas mostraron un crecimiento mucho más rápido y estable que aquellas no transformadas (control).

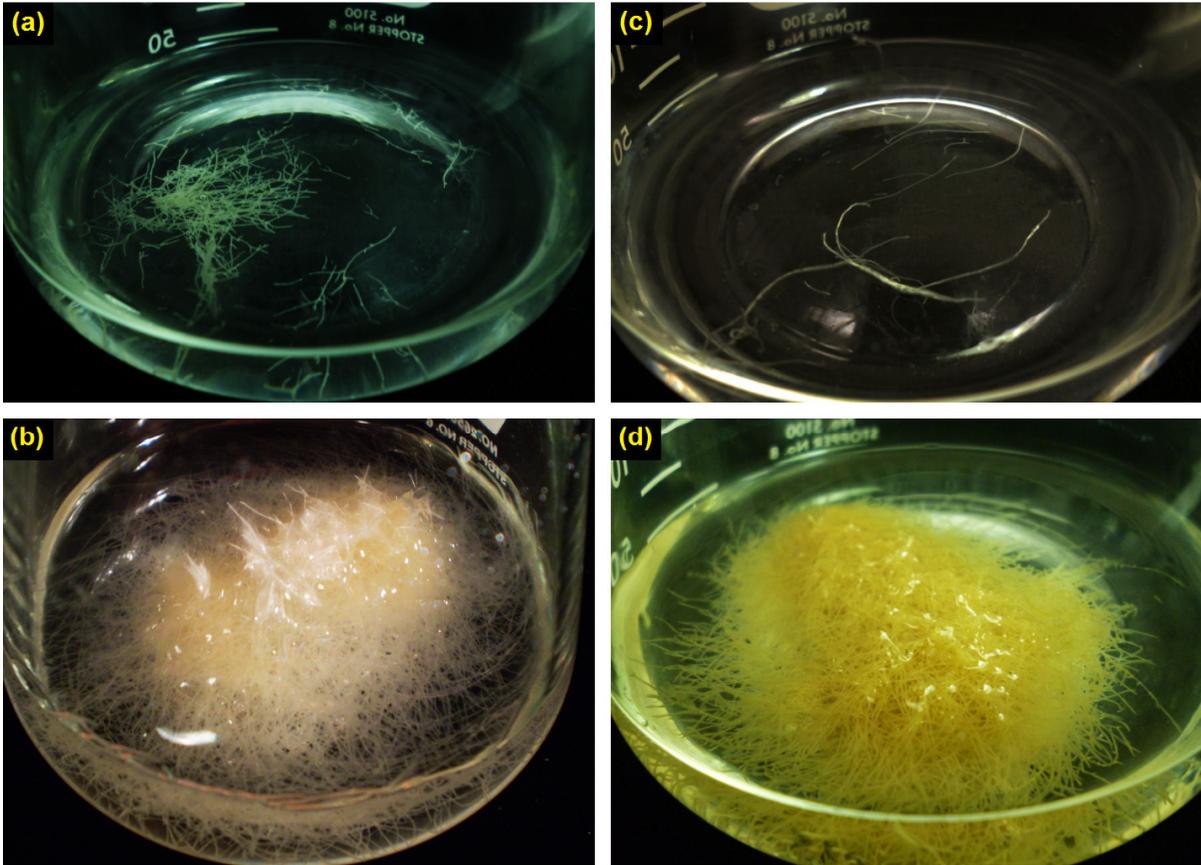


Fig. 9. Raíces cultivadas por 15 días en medio MS sin hormonas. **(a)** raíces no transformadas de *A. montanum*; **(b)** raíces pilosas de *A. montanum*; **(c)** raíces no transformadas de *A. lesbiacum*; **(d)** raíces pilosas de *A. lesbiacum*.

6.2. Confirmación de la transformación a través de la detección del gen *rol B* en raíces pilosas inducidas por *A. rhizogenes*.

Dos especies de plantas fueron usadas en los experimentos de bioacumulación y/o hiperacumulación de Ni: *A. lesbiacum* y *A. montanum*. Con el objetivo de confirmar la transformación de estas raíces se amplificó por PCR la secuencia del gen *rol B* mostraron los fragmentos del tamaño esperado de 652 bp (Fig. 10.) La amplificación mostró una banda de 652 bp para las raíces transformadas de ambas especies (carriles 4,5 y 7,8), mientras que las raíces no transformadas no mostraron amplificación con los primers

(carriles 3 y 6). Lo anterior demuestra la integración de T-DNA de la cepa A4 de *A. rhizogenes* en el genoma de las raíces pilosas de *A. lesbiacum* y *A. montanum*.

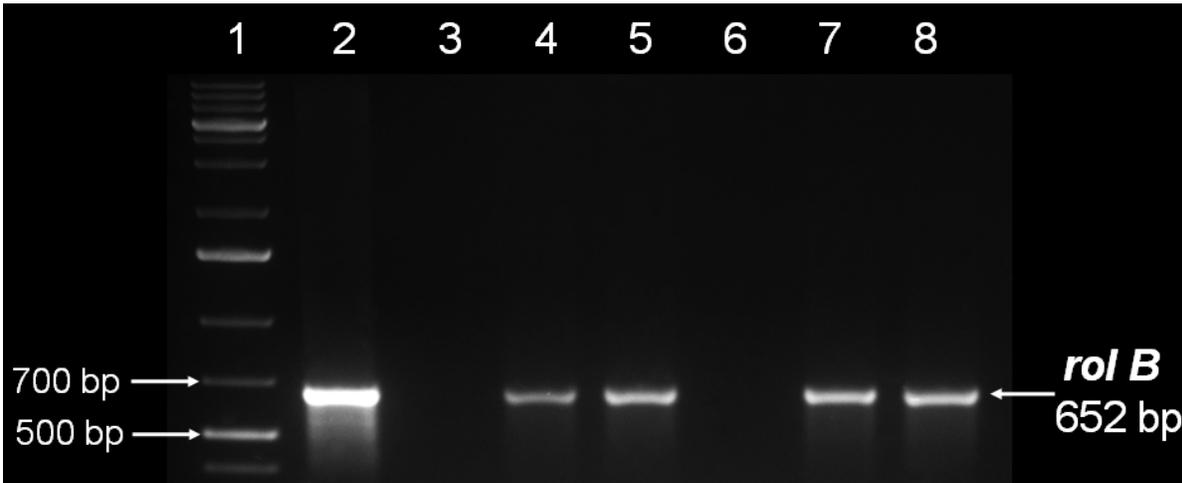


Fig. 10. Detección por PCR del gen *rol B* en DNA de raíces pilosas inducidas por *A. rhizogenes*. Carril 1: GeneRuler™ 1Kb Plus DNA ladder. Carril 2: DNA del plásmido Ri de *A. rhizogenes* A4 (control positivo). Carril 3: DNA de raíces no transformadas de *A. montanum*. Carril 4: DNA de raíces pilosas de *A. montanum* obtenidas por co-cultivo de explantes. Carril 5: DNA de raíces pilosas de *A. montanum* obtenidas por infección en planta completa. Carril 6: DNA de raíces no transformadas de *A. lesbiacum*. Carril 7 y 8: DNA de raíces pilosas de *A. lesbiacum* obtenidas por infección en planta completa, clonas obtenidas a partir de eventos independientes.

6.3. Bioacumulación de Ni en plantas completas y en cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* y *A. montanum*.

6.3.1. Cultivo hidropónico de *A. lesbiacum* y *A. montanum*.

Para probar la hipótesis de que los cultivos *in vitro* de raíces pilosas de la especie hiperacumuladora, *A. lesbiacum*, pueden mantener una capacidad de acumular Ni de forma similar a la planta completa, se realizaron cultivos hidropónicos de esta especie y un control, *A. montanum* (en presencia del metal en el medio de cultivo), para posteriormente comparar las concentraciones de Ni acumulado en estos sistemas con aquellas de cultivos de raíces pilosas. Los sistemas hidropónicos pueden evitar los problemas que surgen a

partir de los diferentes niveles en la biodisponibilidad de un metal en sistemas tales como el suelo u otros sustratos. La implementación y uso de sistemas hidropónicos provee de observaciones más reproducibles en cuanto a la absorción de un metal y/o los mecanismos necesarios para acumularlo. De forma general, una planta con una alta capacidad de tolerancia puede crecer de manera normal en un medio contaminado y por ende la biomasa generada no disminuirá de manera significativa. Después de 14 días de cultivo en medio nutritivo suplementado con Ni, la especie hiperacumuladora, *A. lesbiacum*, mostró una gran tolerancia al metal, manteniendo un crecimiento óptimo bajo los tres tratamientos (300, 600 y 900 μM). La especie *A. montanum* redujo de manera drástica su crecimiento presentando además importantes signos de fitotoxicidad desde la primera semana de permanecer en cultivo bajo estrés por Ni a las tres concentraciones, los síntomas fueron aumentando conforme avanzó el tratamiento. La biomasa generada por la especie hiperacumuladora, tanto de la parte aérea como de las raíces, aumentó bajo las tres concentraciones de Ni y fue mayor que aquella lograda en la ausencia del metal en el medio. Por otro lado, la biomasa generada por la especie no acumuladora se redujo de manera drástica y para los tres tratamientos fue mucho menor que aquella lograda por la población control (Fig. 11).



Fig. 11. Plantas cultivadas en sistemas hidropónicos en una solución con $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ durante 14 d. **(a)** *A. montanum*; **(b)** *A. lesbiacum*.

Usando este sistema de cultivo hidropónico, se comparó la habilidad de *A. lesbiacum* y *A. montanum* para acumular Ni en la parte aérea (Fig. 12). La concentración del metal en la parte aérea de *A. lesbiacum* aumentó de manera significativa conforme aumentó la concentración de Ni en el medio, logrando hasta un máximo de $30880 \mu\text{g g}^{-1}$ (~3% de su peso seco) ante una concentración inicial de $900 \mu\text{M}$, y aún cuando las plantas mostraron signos de clorosis, éstas no mostraron una reducción en su crecimiento. Ambas poblaciones de *A. lesbiacum* registraron un alto contenido de Ni translocado a la parte aérea (18690 y $19130 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente), bajo los tratamientos con las concentraciones de 300 , $600 \mu\text{M}$. A las tres concentraciones fueron superiores a los logrados por *A. montanum* donde la mayor concentración acumulada fue de $6000 \mu\text{g g}^{-1}$ para la población sujeta al tratamiento de $600 \mu\text{M}$. Estos experimentos demuestran la gran capacidad de la especie *A. lesbiacum* para transportar efectivamente al metal Ni desde la raíz a los órganos superiores sin deteriorar su crecimiento y así lograr la hiperacumulación del metal en la parte aérea. A diferencia del contenido de Ni encontrado en la parte aérea, las dos especies no mostraron grandes diferencias en el contenido de Ni registrado en las raíces (Fig.13).

Las concentraciones de Ni encontradas en las raíces de *A. lesbiacum* no disminuyeron significativamente conforme aumentó la concentración inicial de Ni en el medio (14530 , 11250 y $11220 \mu\text{g g}^{-1}$) para los tratamientos 300 , 600 y $900 \mu\text{M}$ respectivamente. Por el contrario los valores de Ni en las raíces de *A. montanum* aumentaron significativamente conforme aumentó la concentración del metal en el medio (8630 , 13220 y $16740 \mu\text{g g}^{-1}$) para los tratamientos 300 , 600 y $900 \mu\text{M}$ respectivamente, mostrando la habilidad de la especie no acumuladora para usar los tejidos de la raíz como barrera y evitar su pase a la parte aérea.

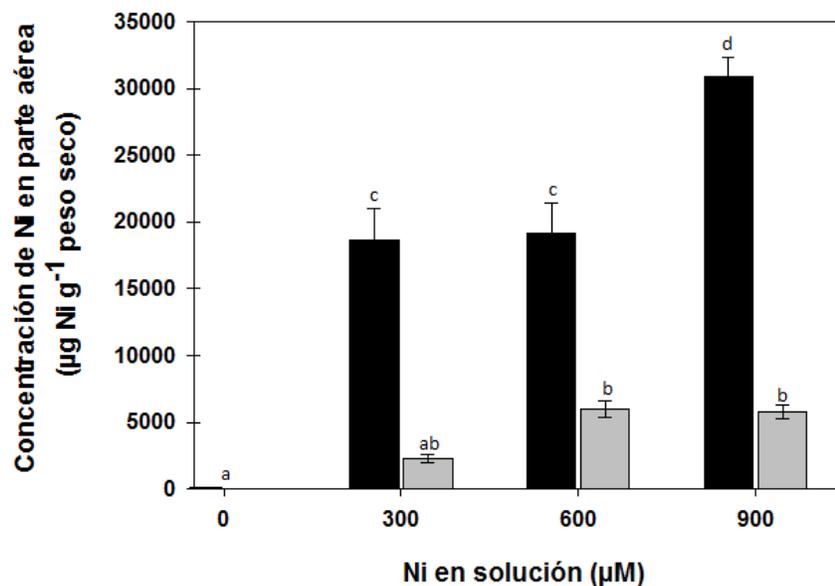


Fig. 12. Acumulación de Ni en la parte aérea de *A. lesbiacum* (■) y *A. montanum* (□) cultivados en medio adicionado con Ni durante 14 d. Estos son los resultados de dos experimentos independientes, cada uno con cinco réplicas (valores promedios \pm E.E); $n=10$. Las letras diferentes en las barras muestran diferencias significativas a $P \leq 0.05$ entre cada tratamiento de acuerdo a una prueba de Tukey.

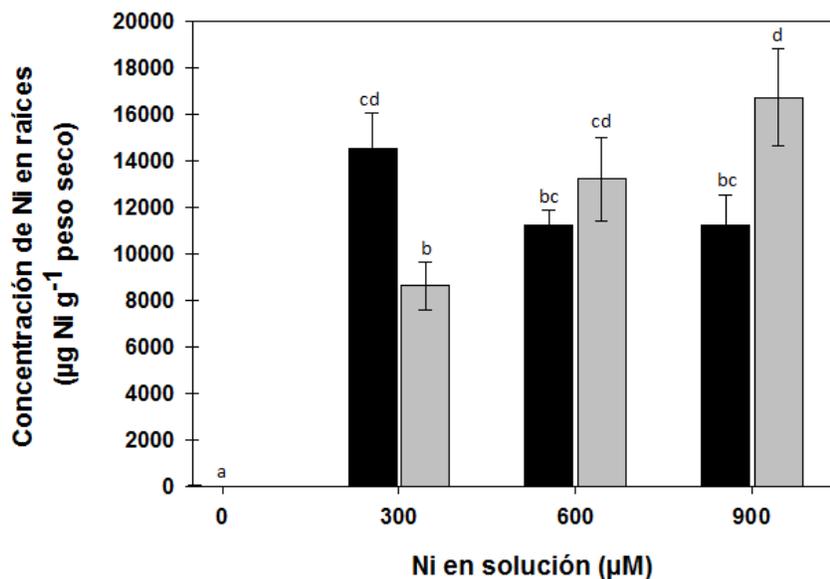


Fig. 13. Acumulación de Ni en las raíces de *A. lesbiacum* (■) y *A. montanum* (□) expuestos durante 14 d. Estos son los resultados de dos experimentos independientes, cada uno con cinco réplicas (valores promedios \pm E.E); $n=10$. Las letras diferentes en las barras muestran diferencias significativas a $P \leq 0.05$ entre cada tratamiento de acuerdo a una prueba de Tukey.

6.3.2. Cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* y *A. montanum*.

Para fines de fitorremediación, lo deseable, es que los organismos a ser usados no excluyan los metales presentes en el medio, sino que puedan acumularlos en grandes cantidades. Los resultados para la bioacumulación de Ni, de los cultivos de raíces de la especie hiperacumuladora, *A. lesbiacum*, y de la especie no hiperacumuladora, *A. montanum*, en un periodo de exposición a largo plazo se muestran en la Fig.14. Las concentraciones de Ni en las raíces pilosas de *A. lesbiacum* mostraron un incremento conforme aumentó la concentración del metal en el medio y en todos los casos los valores fueron superiores a aquél establecido como criterio de hiperacumulación $>1000 \mu\text{g Ni g}^{-1}$, logrando un mínimo de $3850 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ a una concentración de $300 \mu\text{M}$ y un máximo de $7100 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ a una concentración de $900 \mu\text{M}$. Los valores de contenido de Ni logrados por los cultivos de raíces pilosas de la especie no acumuladora fueron significativamente menores a aquellos logrados por las raíces de la especie hiperacumuladora ($\alpha \leq 0.05$).

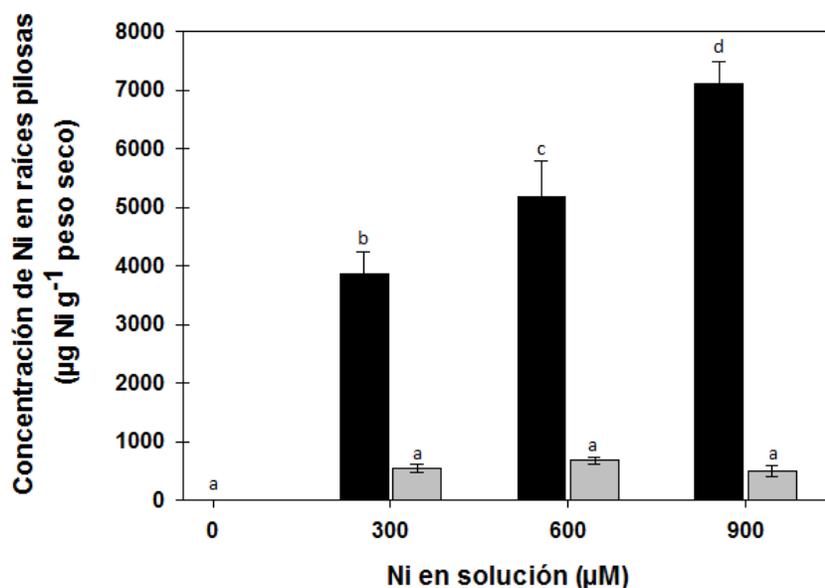


Fig. 14. Acumulación de Ni en los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* (■) y *A. montanum* (□) expuestos durante 14 d. Estos son los resultados de dos experimentos independientes, cada uno con cinco réplicas (valores promedios \pm E.E); $n=10$. Las letras diferentes en las barras muestran diferencias significativas a ($P \leq 0.05$) entre cada tratamiento de acuerdo a una prueba de Tukey.

6.4. Tasa Relativa de Crecimiento

La tasa relativa de crecimiento (TRC) fue determinada para los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* y *A. montanum* en ausencia y presencia de Ni en el medio. Al inicio de este experimento de exposición a largo plazo, se registró el peso inicial de todas las muestras. Los cultivos de raíces pilosas fueron recolectados después de 14 días de exposición y se registró el peso final. Estas muestras fueron posteriormente procesadas y analizadas para su contenido de Ni. Las TRC's fueron calculadas mediante la fórmula descrita por Hoffmann y Poorter (2002):

$$TRC = \frac{\overline{\ln(W_2)} - \overline{\ln(W_1)}}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

donde $\overline{\ln(W)_t}$ es el promedio del peso de las muestras transformado por logaritmo natural al tiempo t , aquí el peso de cada muestra es transformado por logaritmo natural antes de obtener el valor promedio y $(t_2 - t_1)$ es la duración en días del periodo. La TRC es una medida de la eficiencia en el crecimiento de un organismo, es la tasa de producción de nuevo tejido por unidad de tejido existente, es usada para evaluar el efecto de alguna limitante en el medio, sobre el crecimiento. El análisis de la relación entre la TRC y la concentración de Ni en el medio muestra que un incremento en la concentración de Ni está asociada a una reducción en la TRC para las raíces pilosas de *A. montanum*; en este caso, los datos son presentados como porcentaje de crecimiento por día al multiplicar la TRC por 100 (Fig. 15). El peso seco de las raíces pilosas de la especie hiperacumuladora cultivados en un medio con 300, 600 y 900 μM de Ni fue mucho más alto que aquellos de la misma especie en ausencia del metal (control). Por el contrario, el peso seco de las raíces de la especie no acumuladora cultivados en un medio con 300, 600 y 900 μM de Ni fueron considerablemente más bajos, mostrando una reducción de más del 80% de la biomasa lograda con respecto a aquellos de la misma especie en ausencia del metal (datos no mostrados). Al aumentar la concentración de Ni en el medio, un decremento en la TRC en los cultivos de raíces pilosas de la especie *A. montanum* se observó con respecto a la población control en la ausencia del metal mostrando la gran toxicidad generada por el Ni. Las concentraciones de 600 y 900 μM fueron mucho más tóxicas, ambas poblaciones de raíces mostraron un cambio en la coloración y mostraron un decremento en el peso y en la

TRC hasta valores negativos (Fig. 15). Bajo la influencia de ambas concentraciones de Ni en el medio, se mostraron síntomas de necrosis y una inhibición total de crecimiento. La TRC a la concentración de 300 μM mostró inhibición, pero sin detener el crecimiento de las raíces en el medio contaminado. Para el caso de la especie hiperacumuladora, todas las raíces tratadas continuaron su crecimiento y aumentaron el peso sin mostrar efectos visibles de toxicidad por Ni. Las TRC para las concentraciones de 600 y 900 μM fueron significativamente mayores con respecto al tratamiento de 300 μM e incluso con respecto al tratamiento control, mostrando así un efecto positivo del metal en el medio de cultivo, el cual, resultó en un incremento en la biomasa lograda.

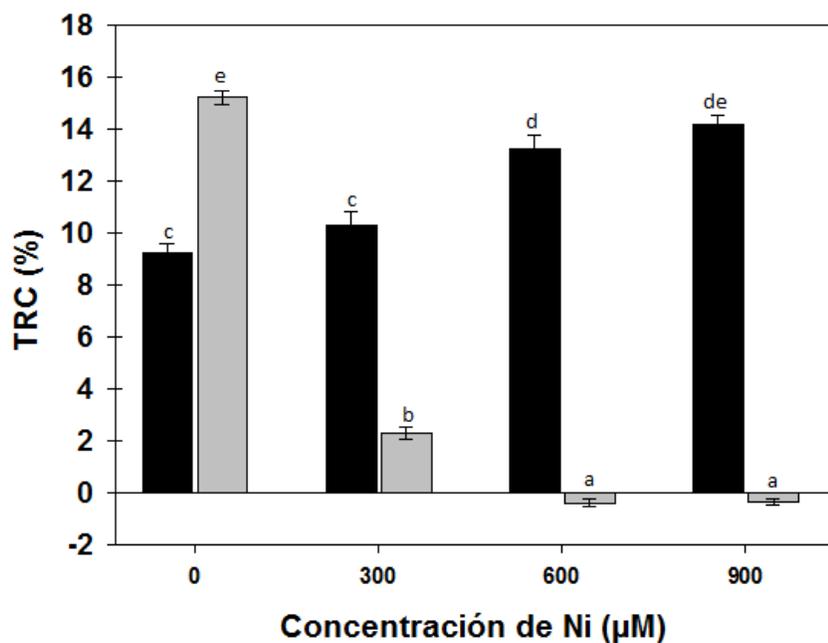


Fig. 15. Tasa relativa de crecimiento (TRC) de cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* (■) y *A. montanum* (□) (basada en peso fresco) expuestos a Ni en el medio durante 14 d. Resultados de dos experimentos independientes, cada uno con cinco réplicas (valores promedios \pm E.E); $n=10$. Las letras diferentes en las barras muestran diferencias significativas a ($P \leq 0.05$) entre cada tratamiento de acuerdo a una prueba de Tukey.

6.5. Acumulación de Ni a corto plazo en cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum*.

Para examinar el efecto del tiempo en la acumulación de Ni, las raíces pilosas de *A. lesbiacum* fueron cultivadas en presencia del metal durante periodos de 1, 6, 12 y 24 h. Los resultados de este experimento de rizoextracción de Ni a corto plazo a una concentración inicial de 52.82 mg L⁻¹ (900 μM) se muestran en la Tabla 7. En términos del contenido, los valores obtenidos durante todo el lapso del experimento fueron superiores a aquel establecido como criterio de hiperacumulación >1000 μg Ni g⁻¹, lográndose un máximo de 8540 μg Ni g⁻¹ a las 24 h y un mínimo de 4466 μg Ni g⁻¹ desde la primera hora de exposición. Se puede observar que al aumentar la concentración del metal en los tejidos de las raíces, la concentración inicial de 52.82 mg L⁻¹ en el medio disminuye conforme avanza el tiempo de exposición, quedando una concentración remanente de 7 mg L⁻¹ después de 24 h de exposición (Tabla 7). Debido a que el parámetro más importante para la fitorremediación es el contenido del metal pesado en la biomasa total producida, se calculó el porcentaje de recuperación de metal a partir del medio. El porcentaje de recuperación de metal fue calculado de la siguiente manera:

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{Factor de Extracción} \cdot \text{Biomasa}}{\text{Volumen del Sustrato}} \cdot 100 \quad (2)$$

donde el factor de extracción se define como el contenido del metal en la biomasa (en gramos de peso seco) dividido entre la concentración inicial del mismo metal en el medio de cultivo. Los resultados de este experimento muestran que el porcentaje de recuperación de Ni está en función del tiempo de exposición de los cultivos de raíces de *A. lesbiacum* a la solución adicionada con el metal. Tomando en cuenta sólo los valores de contenido del metal en los tejidos de raíz, podemos observar que aún desde la primera hora de exposición, se obtiene un valor de 4466 μg Ni g⁻¹, superior al establecido como criterio de hiperacumulación del metal >1000 μg Ni g⁻¹. Por otro lado, los valores de porcentaje de recuperación de Ni en los cultivos de raíces pilosas muestran que en la primera hora sólo se recupera un 28% del metal inicialmente presente. Se puede observar que es necesario

un mínimo de 12 h de exposición para lograr una extracción de Ni que sea mayor al 50%. A 24 h de exposición, se logra una extracción del 82% a una concentración inicial de Ni de 52.82 mg L⁻¹ (Fig. 16).

Para evaluar la efectividad de los cultivos de raíces en la extracción del metal, se usó el coeficiente de bioacumulación (CB), además del porcentaje de recuperación de Ni. El coeficiente de bioacumulación (CB), o índice de fitoextracción, fue calculado como la concentración de metal en las raíces (µg g⁻¹ PS.) dividido por la concentración inicial del metal en la solución (mg L⁻¹). Esta comparación directa, muestra la habilidad de los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* para extraer y acumular Ni a partir de la solución de manera significativa ($P \leq 0.05$) y por encima del 50% después de un lapso mínimo de 12 h de exposición. El CB para los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* expuestos a Ni durante un corto plazo, incrementó en función del tiempo de exposición, 1<6<12<24 (Tabla 7); todos fueron mayores a 1.0 y el CB más alto fue para las 24 h con un valor de 162.

Tabla 7. Acumulación de Ni a corto plazo en cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum*.

Tiempo (h)	Concentración		Cantidad	
	Ni en raíces (µg g ⁻¹ PS. ± E.E.)	Ni en solución ¹ (mg L ⁻¹ ± E.E.)	Raíces (µg ± E.E.)	Coefficiente de Bioacumulación ²
1	4466 ± 535 ^a	35 ± 2 ^c	753 ± 107 ^a	84 ^a
6	5155 ± 303 ^a	30 ± 2 ^c	1039 ± 121 ^a	98 ^a
12	8311 ± 311 ^b	18 ± 1 ^b	1639 ± 55 ^b	157 ^b
24	8540 ± 789 ^b	7 ± 2 ^a	2170 ± 189 ^c	162 ^b

¹ La concentración inicial de Ni en el medio de cultivo era de 52.82 mg L⁻¹. Valores promedios ± E.E.; n=5. Los valores dentro de una misma columna seguidos por letras diferentes indican una diferencia significativa ($P \leq 0.05$), determinado por una prueba de Tukey.

² El coeficiente de bioacumulación es la proporción de la concentración del metal en los tejidos (µg g⁻¹ PS.) con respecto a la concentración del metal en la solución (mg/L), (Dushenkov *et al.*, 1995).

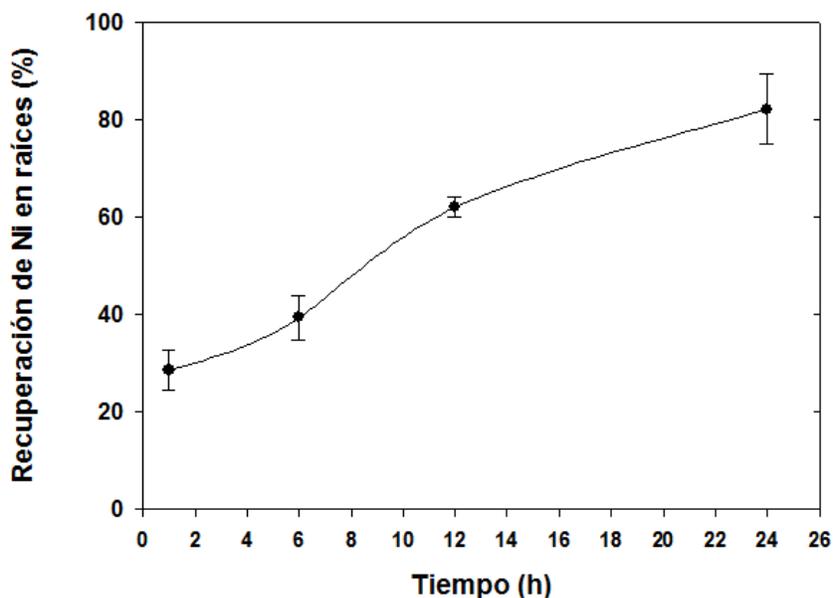


Fig. 16. Recuperación de Ni a corto plazo en raíces pilosas de *A. lesbiacum*. Concentración inicial: 52.82 mg L⁻¹ (Ni, 900 μM). Valores promedios ± E.E; n=5.

6.6. Bioacumulación de Ni, Mn, Co y Pb a corto plazo en cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum*.

La eficiencia en la extracción de un metal de un ambiente contaminado, depende no sólo de la concentración del mismo en la solución, sino además de la presencia y concentración de otros metales presentes. Estos metales adicionales en la solución pueden competir con el metal de interés por su incorporación a los tejidos e intervenir en procesos de especiación, lo cual puede aumentar o disminuir la biodisponibilidad del metal. En comparación a los estudios de captación de un solo metal, existen muy pocos estudios que reporten los efectos interactivos de diferentes metales y su efecto en la captación por parte de los organismos con potencial de uso en fitorremediación. *A. lesbiacum* es una planta conocida por su gran capacidad de hiperacumular Ni, sin embargo, el efecto de las combinaciones con otro tipo de metales tales como el Mn, Co y el Pb presentes en la misma solución y su efecto en la captación del ión Ni no han sido estudiadas. Por lo tanto, se realizó un experimento en presencia de otros metales en las siguientes combinaciones

(Ni), (Ni+Mn), (Ni+Co), (Ni+Pb), (Ni+Co+Mn) y (Ni+Co+Mn+Pb) y a las siguientes concentraciones iniciales: 52.82 mg L⁻¹ (900 μM) de Ni, 54.94 mg L⁻¹ (1000 μM) de Mn, 35.36 mg L⁻¹ (600 μM) de Co y 20.72 mg L⁻¹ (100 μM) de Pb, durante 48 h de exposición para determinar la capacidad de hiperacumulación de Ni y examinar las posibles interacciones entre estos metales que pudieran afectar el proceso de captación e hiperacumulación de Ni en general. Las concentraciones de Ni y los metales Mn, Co y Pb en los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* bajo los diferentes tratamientos se muestran en la Fig. 17. Los resultados muestran que el contenido de Ni incorporado en las raíces pilosas de la especie hiperacumuladora varía conforme las diferentes combinaciones de metales presentes en la solución; se logra una concentración significativamente mayor a 10000 μg Ni g⁻¹ cuando éste se encuentra predominando de manera individual ($P \leq 0.05$). Por el contrario en la presencia de otras mezclas de metales los valores son significativamente menores, con un máximo de 5540 μg Ni g⁻¹ (cuando el Mn se encuentra presente en la mezcla) y un mínimo de 2830 μg Ni g⁻¹ (cuando se encuentra Co y Mn presentes en la mezcla). Todos los valores de contenido de Ni acumulado, de manera individual y bajo las diferentes combinaciones, están por encima del establecido como criterio de hiperacumulación de Ni >1000 μg Ni g⁻¹. Al exponer los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* a las diferentes mezclas de metales, éstos no mostraron signos visibles de fitotoxicidad. Se puede observar también que en todas las mezclas, el Ni no fue el único efectivamente removido por los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* a partir de la solución. En el caso de la mezcla Ni+Mn, la concentración de Mn es significativamente alta, de 8450 μg Mn g⁻¹, muy próxima al valor establecido como criterio de hiperacumulación de Mn >10000 μg Mn g⁻¹. En el caso de las mezclas (Ni+Co), (Ni+Co+Mn) y (Ni+Co+Mn+Pb), las concentraciones de Co logradas son de 3750, 2730 y 2720 μg Mn g⁻¹, respectivamente, valores por encima del establecido como criterio de hiperacumulación de Co >1000 μg Co g⁻¹. En el caso donde la mezcla tiene adicionado el Pb, se obtuvo una concentración máxima de este metal de 6680 μg Pb g⁻¹ y una mínima de 3760 μg Pb g⁻¹, ambos valores por encima del establecido como criterio de hiperacumulación de Pb >1000 μg Pb g⁻¹.

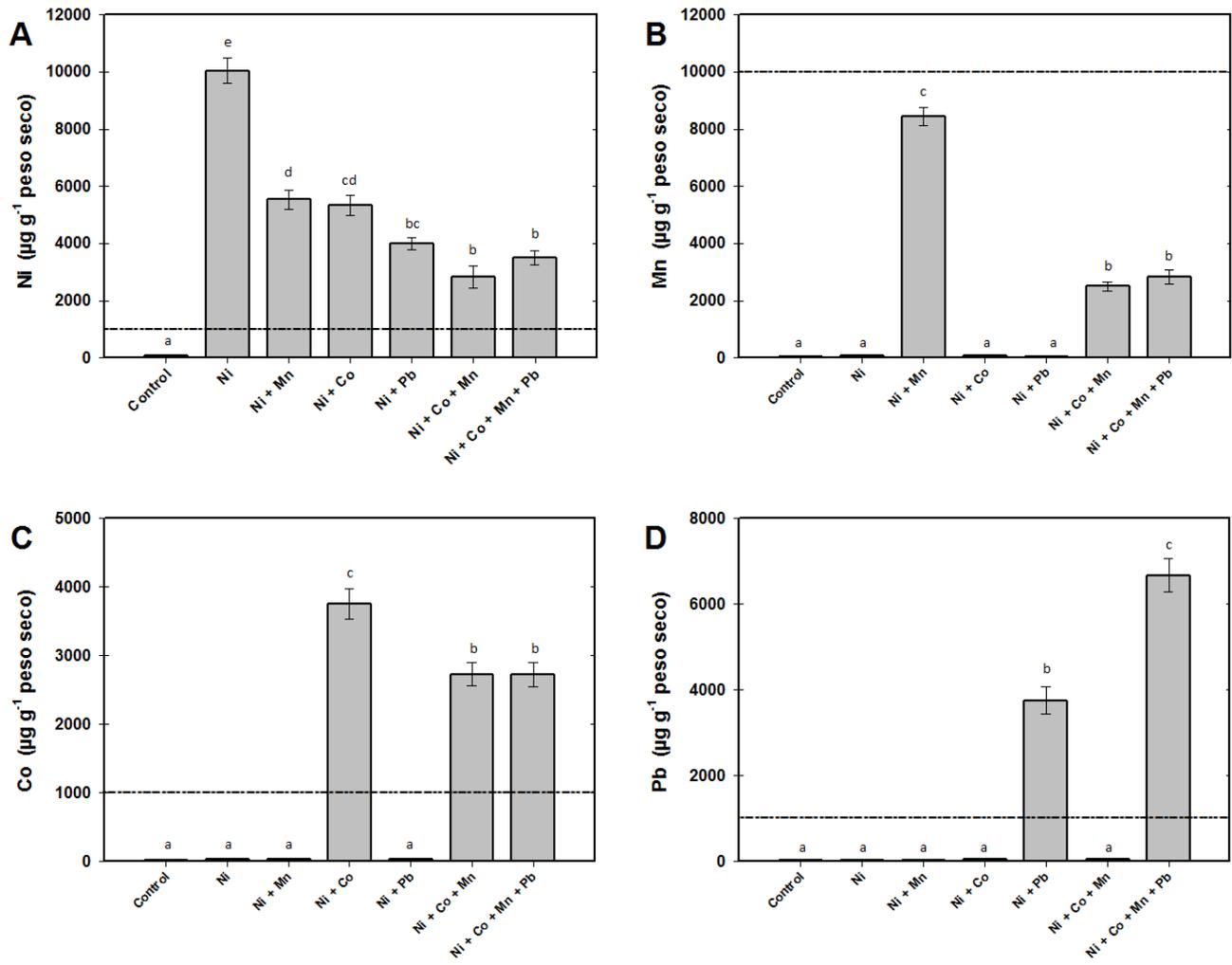


Fig. 17. Acumulación de Ni, Mn, Co y Pb a corto plazo, durante 48 h, en cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum*. Las concentraciones iniciales de los diferentes metales fueron: Ni, 52.82 mg L⁻¹ (900 µM); Mn, 54.94 mg L⁻¹ (1000 µM); Co, 35.36 mg L⁻¹ (600µM); Pb, 20.72 mg L⁻¹ (100µM). Valores promedios ± E.E; n=5. Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre cada elemento acumulado para los diferentes tratamientos de acuerdo a una prueba de Tukey. Las líneas punteadas denotan el valor de la concentración considerado para la hiperacumulación de los elementos en cuestión (Krämer, 2010): Ni >1000 µg g⁻¹; Mn >10,000 µg g⁻¹; Co >1000 µg g⁻¹; Pb >1000 µg g⁻¹.

Si tomamos en cuenta los valores de concentración acumulados para Ni, Co y Pb, podríamos decir que las raíces pilosas de *A. lesbiacum* se comportan como hiperacumuladoras no sólo de Ni, sino también de Co y Pb. Como ya se observó anteriormente, en el caso del experimento de rizoextracción de Ni a corto plazo, considerar

sólo los valores de concentración total no es suficiente para determinar la efectividad total de los cultivos de raíces pilosas en la extracción de un metal a partir de un medio. El potencial de estos cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* como sistemas potencialmente aplicables en técnicas de fitorremediación también está basado en el porcentaje de recuperación de cada metal a partir de un medio. El porcentaje de recuperación para cada uno de los metales se muestra en la Fig. 18. Cuando el Ni se encuentra predominando de manera individual en la solución, se logra un porcentaje de extracción de Ni significativamente mayor del 95% ($P \leq 0.05$) después de 48 h de exposición. El porcentaje de recuperación de Ni de los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* se mostró afectado por la presencia de otros metales en la solución, resultando en la inhibición o el aumento en la recuperación de un metal sobre otro. La presencia de Co y Mn por separado acompañando al Ni fueron los elementos que menos afectaron el porcentaje total de recuperación de este metal a partir del medio, con un 69 y un 53% de recuperación, respectivamente. Mientras que la presencia de Co y Mn de manera simultánea en la mezcla así como la presencia de Pb, redujeron de manera significativa el porcentaje de recuperación total de Ni a partir del medio con valores por debajo del 30% de recuperación a partir de la solución ($P \leq 0.05$). En el caso de la recuperación de Mn, cuando este metal acompaña al Ni en la solución se observa un gran porcentaje de recuperación de hasta un 77%. Sin embargo, la presencia además de Co y Pb disminuyó la recuperación de Mn que fue menor al 20%. En cuanto a la recuperación de Co, cuando este metal se encuentra adicionado al Ni en la mezcla, se alcanza un porcentaje de recuperación del 72%, mostrando que las raíces pilosas de *A. lesbiacum* pueden absorber Co y Ni de manera similar. En cuanto a la capacidad de recuperación de Co, en presencia de otros dos metales (Mn y Pb en este caso), esta disminuyó a un 29 y a un 22%, respectivamente. Por último, en ambas mezclas donde se encuentra adicionado el Pb, es decir, (Ni + Pb) y (Ni+Co+Mn+Pb), en ambos casos se observan importantes porcentajes de recuperación de Pb con 64 y 91% respectivamente, a partir del medio en los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum*. La correlación entre el porcentaje de recuperación de Ni y el porcentaje de recuperación del resto de los metales suplementados en este experimento, puede ser útil para identificar las interacciones elementales que impactarán el proceso final de rizoextracción de Ni a partir de una solución donde éste se encuentra predominando o su biodisponibilidad está bajo la influencia de otros metales.

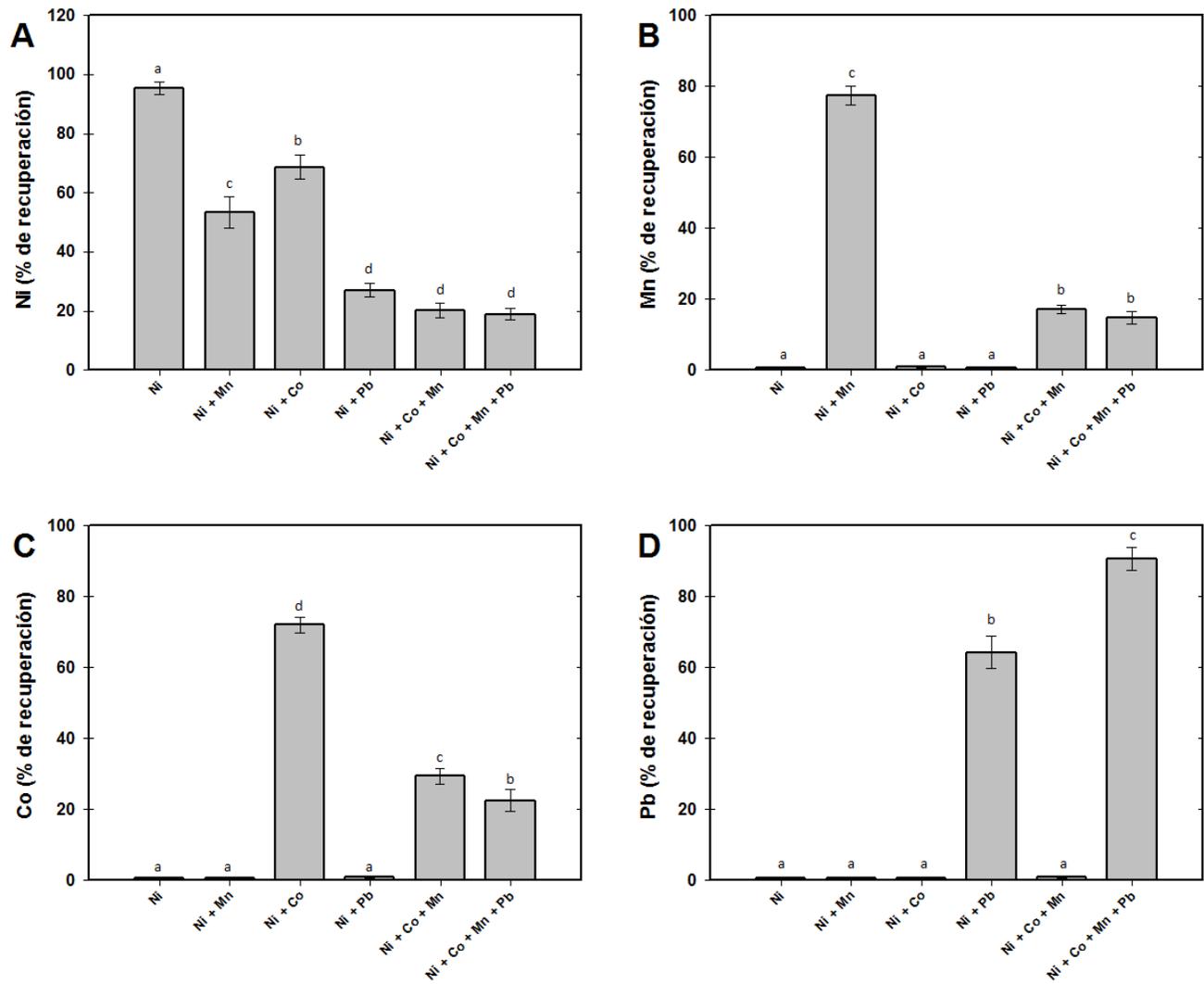


Fig. 18. Porcentajes de recuperación de Ni, Mn, Co y Pb a corto plazo, durante 48 h, en cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum*. Las concentraciones iniciales de metales fueron: Ni, 52.82 mg L⁻¹ (900 μM); Mn, 54.94 mg L⁻¹ (1000 μM); Co, 35.36 mg L⁻¹ (600μM); Pb, 20.72 mg L⁻¹ (100μM). Valores promedios ± E.E; n=5. Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre cada elemento acumulado para los diferentes tratamientos de acuerdo a una prueba de Tukey.

7. Discusión

7.1. Inducción eficiente y establecimiento de cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* y *A. montanum*.

En años recientes, se han logrado grandes avances en diferentes disciplinas con el uso de cultivos *in vitro* de raíces aisladas, especialmente con el cultivo de raíces transformadas (raíces pilosas) generadas por la inoculación de tejidos vegetales con *A. rhizogenes* (Ono y Tian, 2011). El potencial de los cultivos de raíces pilosas con fines de filtración, absorción y acumulación de metales pesados ha sido reconocido desde hace dos décadas (Boominathan y Doran, 2003; Eapen *et al.*, 2003; Nedelkoska y Doran 2000, 2001; Tepfer *et al.*, 1989). Nedelkoska y Doran (2000b) reportaron las propiedades de bioabsorción y el impacto de las concentraciones de diferentes metales en el crecimiento de cultivos de raíces pilosas de plantas hiperacumuladoras de Ni, Cd, Cu y Zn. Algunas de las ventajas de usar cultivos de raíces pilosas son su habilidad para crecer en un medio nutritivo sin la adición de fitohormonas, así como la gran tasa de crecimiento que presentan. Además, en términos de fitorremediación, la naturaleza altamente ramificada (Guillon *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 1991; Shen *et al.*, 1990) y la gran superficie de área que presentan las raíces pilosas, las muestra como agentes potenciales para la filtración de metales pesados a partir de suelo y agua contaminados. En este trabajo de tesis, los métodos usados para la inoculación de tejidos vegetales con *A. rhizogenes* fueron efectivos para obtener raíces pilosas tanto de la planta no hiperacumuladora *A. montanum*, como de la planta hiperacumuladora de Ni *A. lesbiacum*. Se confirmó la naturaleza transformada de estas raíces usando primers para la amplificación de un fragmento del gen *rolB* de *A. rhizogenes*. Para ambas especies, se logró el establecimiento de cultivos uniformes, con un crecimiento activo y estable, necesario para la implementación y análisis de los experimentos de acumulación de Ni. Aún cuando los cultivos de raíces pilosas de ambas especies fueron mantenidos bajo condiciones idénticas, las raíces pilosas de *A. montanum* mostraron un crecimiento más rápido y mucho más ramificado en comparación a las raíces pilosas de *A. lesbiacum* (Fig. 9.). Las diferentes clonas de raíces pilosas obtenidas de ambas especies, y resultantes de eventos independientes de infección con *A. rhizogenes*, fueron muy variables en sus respuestas de crecimiento. Las clonas elegidas para su posterior experimentación, fueron aquellas que demostraron un crecimiento mucho más rápido y estable.

7.2. Los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* mantienen la capacidad de hiperacumular Ni de forma similar a la planta completa de la misma especie.

En este trabajo de tesis, se investigó la tolerancia e hiperacumulación de Ni en cultivos hidropónicos de plantas completas de *A. lesbiacum* y *A. montanum*. Cultivos de raíces pilosas, obtenidos mediante la infección con *A. rhizogenes*, de ambas especies de *Alyssum* también fueron sometidos a un medio adicionado con Ni para determinar su capacidad de tolerancia e hiperacumulación de Ni y compararla con aquellos de las plantas completas. Los sistemas hidropónicos ayudan a evitar los problemas que surgen a partir de los diferentes niveles en la biodisponibilidad de un metal en sistemas tales como el suelo u otros sustratos. La implementación y uso de sistemas hidropónicos provee un mejor control sobre los niveles del metal y de observaciones más reproducibles en cuanto a la tolerancia y absorción del mismo. Como ya se mostró anteriormente en resultados, después de 14 días de cultivo hidropónico en un medio nutritivo con Ni, *A. lesbiacum*, mostró una gran tolerancia al metal, manteniendo un crecimiento óptimo bajo los tratamientos de 300, 600 y 900 μM , mientras que *A. montanum* redujo de manera drástica su crecimiento presentando además importantes signos de fitotoxicidad desde la primera semana de cultivo a las mismas concentraciones y los síntomas fueron aumentando conforme avanzó el tratamiento. La biomasa generada por la especie hiperacumuladora, tanto parte aérea como raíces, aumentó bajo las tres concentraciones de Ni y fue incluso mayor que aquella lograda en la ausencia del metal en el medio (Fig. 11), mientras que la biomasa generada por la especie no acumuladora se redujo de manera drástica y para los tres tratamientos. La concentración del metal en la parte aérea de *A. lesbiacum* aumentó de manera significativa conforme aumentó la concentración de Ni en el medio, logrando hasta un máximo de $30880 \mu\text{g g}^{-1}$ (~3% de su peso seco) ante una concentración inicial de 900 μM de Ni y aun cuando mostró signos de fitotoxicidad tales como clorosis, mantuvo su crecimiento. Aún bajo tratamientos con las concentraciones de 300, 600 μM ambas poblaciones registraron un alto contenido de Ni translocado a la parte aérea (18690 y 19130 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente) y en los tres casos fueron superiores a los logrados por *A. montanum* donde la mayor concentración acumulada fue de 6000 $\mu\text{g g}^{-1}$ para la población sujeta al tratamiento de 600 μM . A diferencia del contenido de Ni encontrado en la parte aérea, las dos especies no mostraron grandes diferencias en el contenido de Ni registrado en las raíces (Fig. 13). Las concentraciones de Ni encontradas en las raíces de *A. lesbiacum* disminuyeron conforme aumentó la concentración inicial de Ni en el medio,

14530, 11250 y 11220 $\mu\text{g g}^{-1}$ para los tratamientos 300, 600 y 900 μM , respectivamente. Por el contrario, los valores de Ni en las raíces de *A. montanum* aumentaron conforme aumentó la concentración del metal en el medio 8630, 13220 y 16740 $\mu\text{g g}^{-1}$ para los tratamientos 300, 600 y 900 μM , respectivamente, mostrando la habilidad de la especie no acumuladora para usar los tejidos de la raíz como barrera y evitar su pase a la parte aérea. Estos datos muestran que la especie hiperacumuladora *A. lesbiacum* tiene la capacidad de translocar un metal como Ni desde su sistema radical hacia la parte aérea, mientras que la especie no acumuladora *A. montanum* (a pesar de ser miembro de un clado hermano) carece de esta capacidad. Esta capacidad de transporte sistema radical-parte aérea es un componente clave en el fenómeno de hiperacumulación y podría ser el resultado de una reducción en el secuestro del metal en las vacuolas de las raíces (Lassat *et al.*, 1998; Richau *et al.*, 2009) o bien, debido a un aumento en la carga del xilema. En *A. lesbiacum* una exposición a Ni conlleva un gran incremento en la concentración de histidina libre (His) en el xilema así como la presencia de complejos $[\text{Ni}^{2+} - \text{His}]$ en la savia del xilema, las raíces y tejidos del tallo (Krämer *et al.*, 1996). Otra evidencia directa que involucra la histidina como un agente quelante en el transporte y/o almacenamiento fue reportada por Kerkeb y Krämer (2003), estos autores encontraron que al tratar a las especies no acumuladoras *Brassica juncea* L. cv. Vitasso y *A. montanum* L. con histidina se incrementaba la acumulación de Ni. Estos resultados mostraron que tanto la tolerancia a Ni, así como la carga de este metal en el xilema y su acumulación en la parte aérea podrían ser inducidos al incrementar la carga de histidina libre de manera exógena (Kerkeb y Krämer, 2003). Esta correlación positiva entre los niveles de histidina y la tolerancia a Ni ha sido confirmada por Wycisk *et al.*, (2004), quienes generaron plantas transgénicas de *Arabidopsis*, diseñadas para sobreexpresar la HisG de *S. typhimurium*. Esta sobreexpresión incrementó las reservas endógenas de histidina libre y dió como resultado una tolerancia elevada de las plantas transgénicas de *Arabidopsis* a los iones Ni^{2+} (Wycisk *et al.*, 2004). Ingle *et al.*, (2005) demostraron que la ruta biosintética de histidina en *A. lesbiacum*, está constitutivamente expresada en mayor proporción que en la especie congénere no acumuladora, *A. montanum*. La sobreexpresión de *HISN1B* (ATP-fosforibosiltransferasa_ATP-PRT) de *A. lesbiacum* en *Arabidopsis* incrementó la concentración endógena de histidina libre y además elevó la tolerancia a Ni, dando mayores argumentos para sugerir que una alta capacidad en la biosíntesis de histidina es un factor determinante en la tolerancia e hiperacumulación de Ni (Ingle *et al.*, 2005).

Nedelkoska y Doran (2001), transformaron diferentes especies de *Alyssum* para obtener raíces pilosas y demostraron que los cultivos de raíces transformadas de *A. bertolonii*, *A. tenium* and *A. troodii* eran tolerantes y podían hiperacumular Ni. Las tasas de absorción de Ni a partir del medio, por raíces pilosas de plantas hiperacumuladoras y resistentes a Ni (*A. bertolonii*, *A. tenium*, *A. troodii*), fueron significativamente mayores que aquellas obtenidas en *Nicotiana tabacum*, una planta susceptible a Ni. La absorción en los cultivos de raíces pilosas y de raíces de plantas no transformadas mostró grandes diferencias. Además, propusieron estos cultivos como sistemas modelo para la generación de un producto enriquecido con metales de interés económico a partir de la biomasa tratada. Después de la exposición a un medio líquido con Ni que resultó en contenidos de Ni que iban del 1.9-7.7% basados en peso seco, la incineración de tejidos de raíces pilosas en un horno a escala de laboratorio, se produjo una “bio-mena” con morfología cristalina la cual contenía hasta un 82% del metal (Boominathan *et al.*, 2004). Para fines de fitorremediación, es altamente deseable que los organismos a ser usados no excluyan los metales presentes en el medio, sino que puedan acumularlos en grandes cantidades. En el caso de las raíces de las plantas completas de *A. montanum*, bajo condiciones de hidroponia, se alcanzan valores de contenido de Ni de hasta 16740 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS, sobrepasando el valor de concentración considerado para la hiperacumulación de Ni. Tomando en cuenta que *A. montanum* es una especie con una tasa de crecimiento y una biomasa general mucho mayor que *A. lesbiacum*, existiría la posibilidad de que los cultivos de raíces pilosas generados a partir de esta especie pudieran acumular un alto contenido de Ni. Sin embargo, las dos especies mostraron un comportamiento contrastante en su respuesta al Ni. La TRC (basada en peso fresco) de las raíces pilosas de *A. montanum* fue, sin presencia del metal, significativamente mayor que la TRC de los cultivos de la especie hiperacumuladora (Fig. 15.). En términos prácticos y para fines de fitorremediación, esto es altamente favorable, pero aun cuando las raíces de las plantas completas de *A. montanum* mostraron altos contenidos de Ni en sus tejidos, ninguno de los valores conseguidos por los cultivos de raíces pilosas de esta especie sobrepasaron el criterio de $>1000 \mu\text{g Ni g}^{-1}$, necesario para considerar una hiperacumulación de Ni. Incluso, un decremento en la TRC para los cultivos de raíces pilosas de *A. montanum*, fue observado al aumentar la concentración de Ni en el medio. Esto sugiere una gran sensibilidad de las raíces pilosas de *A. montanum*, reflejada en su reducción de crecimiento, resultado de la hipersensibilidad en su metabolismo ante el Ni absorbido. Las TRC de las raíces pilosas de *A. lesbiacum*, mostraron un gran crecimiento en presencia de Ni en el medio, para las concentraciones de

600 y 900 μM fueron significativamente mayores con respecto al tratamiento de 300 μM e incluso con respecto al tratamiento control, mostrando así un efecto positivo del metal en el medio de cultivo que resultó en un incremento en la biomasa lograda.

Aun cuando se deben tomar en cuenta factores tales como tipo de sustrato (medio) en el que se realizó la remoción del metal, así como la forma (tipo de sal) en que es adicionado el metal, la duración de la exposición y la concentración del metal, en términos de comparación, los contenidos de Ni en las raíces pilosas de *A. lesbiacum* fueron superiores a aquél establecido como criterio de hiperacumulación $>1000 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ y resaltan con respecto a otros reportados en la literatura. Por ejemplo, mientras que cultivos de raíces pilosas de la especie hiperacumuladora *A. bertolonii* incubadas a concentraciones iniciales de Ni de 20 ppm y 50 ppm, presentaron contenidos de Ni de ~ 1000 y $\sim 2500 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ respectivamente antes de 15 días de exposición (Nedelkoska y Doran, 2001), en nuestro experimento las concentraciones de Ni en las raíces pilosas de *A. lesbiacum* mostraron una concentración de $3855 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ a una concentración inicial de 17 ppm y una concentración de $7100 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ a una concentración de 52 ppm durante un periodo de 14 d. Boominathan y Doran (2002), mostraron que las raíces pilosas de la especie hiperacumuladora de Ni *A. bertolonii* tenían un contenido $<1000 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ alrededor de los 14 días de exposición a un medio con una concentración inicial de 25 ppm de Ni. En otro experimento bajo condiciones experimentales que involucraban el mismo periodo de exposición y concentración inicial de Ni, muestran contenidos $<1000 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ para las raíces pilosas de *A. bertolonii* (Boominathan y Doran, 2003). Por otro lado, los resultados obtenidos resaltan también con respecto a otros órganos vegetales expuestos a Ni. Vinterhalter *et al.*, (2008) usaron cultivos de tallos regenerados a partir de raíces pilosas de la especie hiperacumuladora de Ni *A. murale*. Dichos cultivos al ser expuestos a una concentración de 1000 μM de Ni lograron una concentración máxima de $1990 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ después de una exposición de 35 días.

En este trabajo, los resultados obtenidos muestran que los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* en un periodo de exposición largo (14 d) pueden extraer y acumular Ni a partir del medio. Los resultados muestran que los cultivos de raíces pilosas mantienen la capacidad de hiperacumulación con respecto a las raíces sin transformar de la planta completa, pero esta capacidad disminuye con respecto a los tejidos de la planta completa. Estos resultados son similares a lo reportado por Nedelkoska y Doran (2001), ya que estos

autores mostraron una reducción en la capacidad de acumulación lograda por los cultivos de raíces pilosas en comparación con plantas completas regeneradas en cultivos hidropónicos. Por otro lado, aún cuando los valores de concentración de Ni en los tejidos de las raíces pilosas disminuyen con respecto a los tejidos de las raíces sin transformar y de la parte aérea de la misma especie, todos son valores por encima de $1000 \mu\text{g Ni g}^{-1}$. Además de los valores de concentración obtenidos de Ni en las raíces pilosas de *A. lesbiacum*, la TRC de las raíces pilosas en presencia del metal, sugieren la aplicación potencial de estos cultivos de raíces en la extracción de Ni a partir de soluciones acuosas. La diferencia en la capacidad total entre los tejidos de las raíces pilosas y los tejidos de los diferentes órganos de las plantas completas de *A. lesbiacum* para concentrar Ni, podría ser balanceada por la capacidad de crecimiento y facilidad de propagación de los cultivos de raíces pilosas, lo cual permitiría la generación de una mayor biomasa que pueda acumular Ni. Además estos cultivos de raíces pilosas podrían ser de gran utilidad en estudios fisiológicos y morfológicos para el entendimiento del papel que desempeñan las raíces de especies hiperacumuladoras en la toma y transporte de metales pesados.

Con respecto a la definición de hiperacumulación, Reeves (1992) sugirió: un hiperacumulador de Ni es una planta en donde una concentración de Ni es de al menos 1000 mg/kg (basado en peso seco) y esta ha sido registrada en cualquier tejido aéreo en al menos un espécimen creciendo en su hábitat natural. En este trabajo, las raíces pilosas de la especie hiperacumuladora *A. lesbiacum* son tolerantes a altas concentraciones de Ni, mantienen un crecimiento en presencia del metal y pueden lograr una concentración $>1000 \text{ mg/kg}$. Estos factores podrían ser considerados para un concepto operacional de hiperacumulación que involucre no sólo organismos colectados en los sitios naturales de crecimiento, sino además organismos o cultivos de tejidos manipulados genéticamente que presenten una gran capacidad de absorción y acumulación ante la presencia de un metal pesado.

7.3. Las raíces pilosas de *A. lesbiacum* pueden absorber e hiperacumular Ni a partir de una solución en un periodo corto de exposición.

La absorción de iones metálicos específicos se da como resultado de un balance entre la regulación en la toma del metal y los mecanismos de transporte, detoxificación y almacenaje (Krämer *et al.*, 2007). Por consiguiente, el tiempo de exposición ante un metal dado es importante para lograr un máximo de hiperacumulación. Para examinar el efecto del tiempo en la acumulación de Ni, cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* fueron cultivados en presencia del metal durante periodos de 1, 6, 12 y 24 h. Los resultados obtenidos indicaron que al aumentar la concentración del metal en los tejidos de las raíces, la concentración inicial de 52.82 mg L⁻¹ en el medio disminuye conforme avanza el tiempo de exposición, dejando una concentración remanente de 7 mg L⁻¹ después de 24 h de exposición. En términos del contenido de Ni, los valores obtenidos durante todo el lapso del experimento fueron superiores a aquél establecido como criterio de hiperacumulación >1000 µg Ni g⁻¹, lográndose un máximo de 8540 µg Ni g⁻¹ a las 24 h. El contenido de 4466 µg Ni g⁻¹ (1 h) y 5155 µg Ni g⁻¹ (6 h), para los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum*, es mayor a lo reportado por Nedelkoska y Doran (2000b, 2001) para las raíces pilosas de las especies hiperacumuladoras *A. bertolonii*, *A. tenium* y *A. troodii*, los cuales obtuvieron <1600, <1200 y <1100 µg Ni g⁻¹, respectivamente, durante 9 h de exposición a un medio con una concentración inicial de 20 ppm de Ni.

En términos de hiperacumulación, si se toman en cuenta sólo los valores de contenido del metal en los tejidos de las raíces, aun desde la primera hora de exposición, se logra un valor de 4466 µg Ni g⁻¹. Hasta ahora, datos experimentales que apoyen la aplicación práctica de la fitoextracción, son aún limitados (Keller y Hammer, 2004). Para evaluar la capacidad de extracción de metales de una planta, algunos autores sólo definen a las plantas acumuladoras como aquellas que tienen altas concentraciones de metales con respecto a otras especies. Otros autores (Baker *et al.*, 1994; Homer *et al.*, 1991; Krämer *et al.*, 1996; McGrath y Zhao, 2003; Sun *et al.*, 2008) han incluido al Coeficiente de Bioacumulación-CB (o Factor de Bioacumulación-BF) para cuantificar la acumulación de metales pesados en la biomasa, comparar resultados entre especies y como un elemento para la clasificación de especies hiperacumuladoras. El CB hace referencia a la concentración del metal en la planta y la proporción de la concentración del metal en el sustrato. Esta proporción debería ser mayor a 1.0 para su inclusión en la categoría de

hiperacumulación. El coeficiente de bioacumulación, muestra la habilidad de los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* para extraer y acumular Ni a partir de la solución de manera significativa ($P \leq 0.05$) y por encima del 50% después de un lapso mínimo de 12 h de exposición. El CB para los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* expuestos a Ni durante un corto plazo, incrementó conforme el tiempo de exposición, 1<6<12<24 (Tabla 7), todos fueron mayores a 1.0 y el CB más alto fue de 162 a las 24 h. La máxima concentración lograda por los cultivos de raíces pilosas a 900 μM (Tabla 7), fue similar a los niveles acumulados bajo el mismo tratamiento en el experimento a largo plazo (Fig. 14). Por otro lado, la eficiencia de las plantas en la fitoextracción depende no sólo de la concentración del metal en la biomasa, sino además del rendimiento en la biomasa de las plantas (Neugschwandtner *et al.*, 2008). Para esto se propuso calcular el porcentaje de recuperación del metal. Esto permite tener un estimado de la recuperación total del metal en la biomasa (Dushenkov *et al.*, 1995; Mertens *et al.*, 2005; Vyslouzilová *et al.*, 2003). Tomando en cuenta los porcentajes de recuperación, se puede observar que en la primera hora sólo se recupera un 28% del metal inicialmente presente. Bajo estas condiciones, es necesario un mínimo de 12 h de exposición para lograr una remoción de Ni que sea mayor al 50%. Con un lapso de tiempo de 24 h de exposición, se logra una remoción del 82%. Estos resultados contrastan con respecto a los obtenidos por Nedelkoska y Doran (2001), ya que estos autores reportan un porcentaje de recuperación de Ni para raíces pilosas de la hiperacumuladora *A. bertolonii* de un máximo de 32% después de 10 d de exposición a una concentración inicial de Ni de 50 ppm, y alcanza un 39% a una concentración inicial de 20 ppm después de 5 d de exposición. Cultivos de raíces pilosas de la especie hiperacumuladora *A. tenium* presentan hasta un 20% de recuperación de Ni a una concentración inicial de 20 ppm de Ni, sólo hasta después de los 15 d de exposición (Nedelkoska y Doran, 2001). En términos de cantidad de Ni extraída del medio acuoso, las raíces pilosas de la especie *A. bertolonii* (concentración inicial de 50 ppm de Ni), obtienen hasta 790 μg de Ni después de 10 d y hasta 940 μg de Ni (concentración inicial de 100 ppm de Ni) después de 15 d de exposición (Nedelkoska y Doran, 2001). En cambio, para los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* se logra obtener una cantidad de por lo menos 753 μg de Ni después de 1 h y hasta 2170 μg de Ni después de 24 h de exposición a una concentración inicial de 52 ppm (Tabla 7). Una absorción significativa de Ni se puede lograr en un periodo relativamente corto de 24 h, característica favorable en términos de fitoextracción, si la finalidad es reducir la cantidad de energía que se invertirá para mantener a los cultivos de raíces dentro de un bioreactor.

7.4. Las raíces pilosas de *A. lesbiacum* pueden acumular Ni, Mn, Co y Pb a partir de una misma solución.

La mayoría de los métodos convencionales para la remoción de metales pesados a partir de aguas residuales se caracterizan por ser relativamente costosas y tener baja eficiencia a concentraciones bajas de metales pesados, particularmente en el rango de 1-100 mg L⁻¹, algunos de estos métodos generan además subproductos potencialmente tóxicos (Davila *et al.*, 1992; Kapoor y Viraraghavan, 1995; Srivastava y Majumder, 2008; Wilde y Benemann, 1993). La habilidad de materiales de tipo biológico para absorber y adsorber iones metálicos ha recibido una atención considerable para el desarrollo de una tecnología eficiente, limpia y relativamente de menor costo para el tratamiento de aguas residuales a concentraciones bajas de hasta 1 mg L⁻¹ (Chong y Volesky, 1995). Se han reportado estudios de acumulación de metales pesados en cultivos de raíces pilosas de especies acumuladoras e hiperacumuladoras con fines de fitorremediación, Cd para *Thlaspi caerulescens*, *Nicotiana tabacum* y *Solanum nigrum*; Ni para *Alyssum bertolonii*, *A. tenium* y *A. troodii*; Cu para *H. capitata*, *P. longiflora*, *E. hirta* y *N. tabacum*; Uranio (U) para *Brassica juncea* y *Chenopodium amaranticolor* (Boominathan y Doran, 2003; Eapen *et al.*, 2003; Macek *et al.*, 1994; Nedelkoska y Doran, 2000b, 2001). Estos estudios se caracterizan por estar limitados a especies individuales de iones metálicos y no existe información para la acumulación de metales pesados en raíces pilosas en sistemas binarios, terciarios o multi-metales. Las aguas residuales, sin embargo, bajo la mayoría de las condiciones contienen no sólo un metal, sino múltiples metales pesados. El Mn, Co y Pb, entre otros, usualmente acompañan al Ni en efluentes o cuerpos de agua de descarga industrial a diferentes concentraciones (Chakraborty *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Yaman y Bakirdere, 2003). El efecto individual del exceso de Ni, Mn, Co y Pb en las plantas está bien documentado. En conjunto, estos metales habrán de causar efectos interactivos, dependiendo del número de metales (compitiendo por sitios de unión y entrada), la combinación de estos metales y los niveles de concentración inicial de los mismos. La naturaleza de los metales pesados en la mezcla, la variabilidad en la exposición, los rangos de sensibilidad del propio organismo receptor, son factores cruciales que determinarán el tipo e intensidad de las respuestas de las raíces ante la acumulación de un metal. Tomando en cuenta lo anterior, el examinar el efecto de la presencia de varios metales y sus combinaciones, sería mucho más representativo de los problemas ambientales que existen actualmente (Aksu *et al.*, 2002; Benguella y Benaissa, 2002; Mohan y Singh, 2002; Pagnanelli *et al.*, 2001). Para metales

con similitudes químicas donde no existe interacción, se puede esperar un efecto aditivo, en este caso la toxicidad de la mezcla es igual a la suma de las concentraciones de los componentes. Los términos de sinergismo y antagonismo han sido ampliamente usados para describir interacciones negativas o positivas. En un efecto antagónico, existe una interacción negativa, en la que la toxicidad de la mezcla es menor que la suma de las toxicidades individuales, por ejemplo el Selenio (Se) puede reducir la toxicidad del Mercurio (Hg) (Oliver 1997; Mounicou *et al.*, 2006). Mientras que en un efecto sinérgico, existe una interacción positiva o potenciación de las toxicidades, por lo que la toxicidad es mayor que la suma de las toxicidades individuales (Ince *et al.*, 1999; Pedersen y Petersen, 1996). Por lo tanto, es necesario realizar experimentos que permitan evaluar la bioacumulación en sistemas multi-metales dada la aparición común de mezclas complejas de metales pesados como contaminantes en diferentes sistemas de agua y suelo (Chapin, 2004; Teuschler *et al.*, 2002). Aun cuando existe ya un gran número registrado de especies de plantas capaces de hiperacumular metales pesados en sus tejidos aéreos, muy pocas pueden ser utilizadas de manera óptima en fitorremediación de sitios contaminados con una mezcla de metales pesados, ya que su crecimiento y desempeño disminuyen de manera drástica conforme incrementa la concentración de los metales y la cantidad de los mismos presentes en el medio (January *et al.*, 2008; Marchiol *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2006; Tanhan *et al.*, 2007). En la fitorremediación de ambientes polimetálicos existen limitantes como: a) existe una dominancia diferente, dependiendo del metal y la concentración, para todos los metales presentes en la mezcla, lo cual afecta en gran manera la productividad de las plantas hiperacumuladoras de metales, ya que la resistencia a cada metal está regulada por uno o dos genes por metal (Ernst *et al.*, 2000; Walker y Bernal, 2004); b) la hiperacumulación de metales pesados en la parte aérea es altamente específica para especies y ecotipos, sólo algunas especies pueden hiperacumular hasta dos metales (Brooks y Robinson, 1998); c) la toma, transporte y acumulación de metales pesados está sujeta a efectos antagónicos, sinérgicos y aditivos que son ejercidos entre los diferentes metales presentes en una mezcla (Grifferty y Barrington, 2000; Podar *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2010). Como se ha venido discutiendo, la capacidad de absorción de un metal en las raíces, dependerá entonces no sólo de la concentración del metal en el medio, sino además de la presencia y concentración de otros metales pesados acompañando al metal de interés. En este trabajo, uno de los objetivos, fue evaluar la absorción de iones de Ni^{2+} por las raíces pilosas de *A. lesbiacum* en sistemas individuales, binarios y multi-metales (Ni, Ni+Mn, Ni+Co, Ni+Pb, Ni+Co+Mn y Ni+Co+Mn+Pb) y observar la interferencia del efecto

competitivo de los otros tres iones metálicos en la acumulación de Ni^{2+} . Tanto Co como Mn, han sido reportados en concentraciones por encima de rangos de hiperacumulación en especies de *Alyssum*, mientras que Pb es uno de los metales más tóxicos presentes en soluciones contaminadas con iones metálicos. Los resultados mostrados en esta tesis (Fig. 17) indican que el contenido de Ni incorporado en las raíces pilosas de la especie hiperacumuladora varía conforme las diferentes combinaciones de metales presentes en la solución, logrando una concentración por encima de $10000 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ cuando este metal estaba presente de manera individual. Por el contrario, en una solución binaria (Ni + Mn) se obtuvo un máximo de $5540 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ (Ni + Mn) y un mínimo de $2830 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ como efecto de una solución (Ni + Mn + Co). Todos los valores de contenido de Ni acumulado, en los diferentes tratamientos, están por encima del establecido como criterio de hiperacumulación de Ni. Para las mezclas (Ni + Co), (Ni + Co + Mn) y (Ni + Co + Mn + Pb), los valores de concentración acumulados para Ni, Co y Pb, sugieren que las raíces pilosas de *A. lesbiacum* se comportan como hiperacumuladoras de Ni, Co y Pb. En términos de porcentajes de recuperación de cada metal a partir del medio, se observa un decremento en la efectividad de remoción de los metales. Cuando el Ni se encuentra predominando de manera individual en la solución, se logra un porcentaje de extracción de Ni significativamente mayor de hasta 95 % ($P \leq 0.05$) después de 48 h de exposición (Fig. 18). El porcentaje de recuperación de Ni en los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* es afectado por la presencia de otros metales en la solución, resultando en la inhibición o el aumento en la recuperación de un metal sobre otro. Co y Mn, acompañando por separado al Ni, fueron los elementos que menos afectaron el porcentaje total de recuperación de éste a partir del medio, con un 69 y un 53 % de recuperación, respectivamente (Fig. 18). Mientras que la presencia de Co y Mn de manera simultánea en la mezcla así como la presencia de Pb, redujeron de manera significativa el porcentaje de recuperación total de Ni a partir del medio con valores por debajo del 30% de recuperación a partir de la solución ($P \leq 0.05$). Las raíces pilosas sometidas al tratamiento (Ni + Mn + Co) tuvieron una mayor acumulación de Co, sugiriendo un efecto sinérgico sobre este metal. El Co frecuentemente interactúa antagónicamente con metales como Ni, Fe y Mn (Palit *et al.*, 1994). En el caso de la mezcla (Ni + Mn), se observa un gran porcentaje de recuperación de Mn (hasta un 77%), mostrando así un efecto antagónico de Mn sobre Ni. Era de esperarse que Mn y Co interactuaran de manera antagónica sobre Ni, esto como resultado de su competencia por proteínas de transporte semiselectivas en las raíces, además de competir por ligandos intracelulares tales como la histidina o la nicotianamina (Callahan *et al.*, 2007; Kim *et al.*,

2005; Sharma y Dietz, 2006; Stepansky y Leustek, 2006). Además, muchas proteínas ligantes de iones metálicos a menudo pueden no distinguir elementos adyacentes en la tabla periódica (Pennella y Giedroc, 2005; Waldron y Robinson, 2009). La presencia de Co y Pb disminuyó la recuperación de Mn que fue menor a 20%. En cuanto a la recuperación de Co, cuando este metal se encuentra adicionado al Ni en la mezcla, se alcanza un porcentaje de recuperación del 72% de Co a partir de la solución, mostrando que las raíces pilosas de *A. lesbiacum* pueden absorber también el Co. De manera similar a la capacidad de recuperación de Mn, en presencia de otros dos metales (Mn y Pb en este caso), la capacidad de recuperación de Co disminuyó a un 29 y a un 22%, respectivamente. En ambas mezclas donde se encuentra adicionado el Pb, es decir, (Ni + Pb) y (Ni + Co + Mn + Pb), se observan importantes porcentajes de recuperación de Pb (64 y 91%) a partir del medio por los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum*. En cuanto a la recuperación de Ni en la mezcla (Ni + Pb), aún cuando se alcanza una recuperación del 27 % y se registra una concentración de $3990 \mu\text{g Ni g}^{-1}$, la diferencia es muy grande en comparación a la absorción de Ni cuando el metal se encuentra de forma individual, logrando una recuperación de más del 90%. Es importante hacer notar, que el Pb mostró un efecto antagónico sobre la acumulación y extracción de Ni, Mn y Co; esto podría deberse a la competencia entre metales en los sitios de absorción en las raíces. Por otro lado, la absorción de Pb en la solución binaria (Ni + Pb) es mucho menor que en la solución multi-metal (Ni + Co + Mn + Pb), más de un 20%, esto puede ser atribuido a la presencia de Co y Mn, los cuales compiten con Ni en lugar de Pb. Químicamente (masa molecular y radio iónico) Co y Mn, comparten muchas similitudes con Ni, estas similitudes entre iones metálicos fomentan su competencia en los mismos sitios activos y disminuyen la competencia de cada uno con respecto al Pb. Existen reportes que muestran un incremento en la acumulación de Pb en presencia de otros metales como Cu y Zn (An *et al.*, 2004; MacFarlane y Burchett, 2002).

La eficiencia en la acumulación de Ni depende no sólo de la concentración del mismo en la solución, sino además de la presencia y concentración de otros metales presentes en la solución, en este caso Mn, Co, Pb. Estos términos de competencia, Mn, Co y Pb pueden competir en la solución con Ni por su incorporación a los tejidos de las raíces pilosas, pero además en el mismo medio pueden intervenir en procesos de especiación, lo cual puede aumentar o disminuir la biodisponibilidad de Ni para los cultivos de las raíces pilosas. Cabe resaltar, que al exponer los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* a las diferentes

mezclas de metales, estos no mostraron signos visibles de fitotoxicidad. Esto podría ser a causa de la habilidad inherente a esta especie hiperacumuladora para hacer frente a la toxicidad provocada por metales pesados, ya que este tipo de especies hiperacumuladoras muestran una gran capacidad antioxidante en comparación con otras especies no acumuladoras (Boominathan y Doran, 2002; 2003). Al igual que otros metales, el Co causa toxicidad en las plantas cuando se presenta en altas concentraciones, pero pueden lidiar con un exceso del metal mediante diferentes mecanismos (Micó *et al.*, 2008). En plantas superiores el Co se ha visto que está adherido a las raíces y se cree que es incorporado principalmente a través de transporte pasivo. La concentración de Co en las plantas se encuentra generalmente en rangos que van de 0.1 a 10 ppm en base a peso seco (Palit *et al.*, 1994). Con la excepción de algunas plantas hiperacumuladoras (*Berkheya coddii*, *A. corsicum*) y de algunas pertenecientes a las familias Lamiaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Cyperaceae, la mayoría de las plantas no acumulan Co de una manera significativa. Baker *et al.*, en el 2000, reportaron una lista de 26 hiperacumuladores de Co, los cuáles contenían más de 1000 ppm de Co en tejidos aéreos y la mayoría pertenecientes a las familias de Lamiaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae y Fabaceae. Homer *et al.*, (1991) y Malik *et al.*, (2000) demostraron que muchas especies hiperacumuladoras de Ni, incluyendo *A. murale* y *A. corsicum* pueden además hiperacumular Co.

El ión Ni^{2+} está relacionado con el Co^{2+} , tanto en sus propiedades químicas como en sus propiedades bioquímicas, de forma tal que el Co podría ser incorporado en la células a través de los mismos transportadores en la membrana plasmática que incorporan al Ni. Se han encontrado transportadores para Co y Ni en procariontes y hongos, y recientemente se ha propuesto que ambos elementos pueden estar co-regulados en *Lotus japonicus* (Chen *et al.*, 2009). Por otro lado, Baxter *et al.*, en el 2008 encontraron que en plantas de *Arabidopsis* cultivadas en bajos niveles de Fe en el medio la concentración de Co en la parte aérea aumentaba por incremento en la expresión del transportador de Fe IRT1 (Iron Regulated Transporter-Like Protein). Concluyendo así que el Co podría ser transportado por el transportador IRT1. Las plantas poseen una gran variedad de genes que codifican para proteínas CDF (Cation Diffusion Facilitators), además existe evidencia de que algunas de éstas están involucradas en la tolerancia a metales pesados. Persans *et al.*, (2001) aislaron genes (*TgMTPs*) que codifican proteínas CDF de la especie hiperacumuladora de Ni *Thlaspi goesingense*, la cual confiere tolerancia a metales a mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* con inactividad en COT1 (Copper Transporter) y ZRC1 (Zinc-

Resistance-Conferring). Tanto COT1 como ZRC1 son proteínas de levaduras de la familia CDF que confieren tolerancia a Zn^{2+} y Co^{2+} y están localizadas en la membrana vacuolar (Li y Kaplan, 1998). Persans *et al.*, (2001) también sugirieron que las proteínas TgMTP1 (Thlaspi goesingense Metal Tolerance Protein) están involucradas en el transporte de metales a la vacuola, aunque la localización de las proteínas *in vivo* así como sus actividades como transportadores aun están por ser demostradas en levaduras y plantas. Keeling *et al.*, en el 2003 analizaron a la especie hiperacumuladora de Ni, *Berkheya coddii* al extraer Co y Ni a partir de un sustrato metalífero. Ellos observaron que el Co era incorporado con o sin la presencia de Ni, pero la toma de Ni se veía inhibida por la presencia de una concentración similar de Co. El coeficiente de bioacumulación de Ni y Co para los sustratos con los elementos presentes de manera individual fueron de 100 y 50 respectivamente. En el sustrato mezclado con Ni-Co se produjeron coeficientes de bioacumulación de 22 tanto para Ni como para Co. Cuando esta especie es cultivada en presencia de ambos elementos, el coeficiente de bioacumulación se ve reducido en comparación al logrado en los sustratos con los elementos presentes de manera independiente (Keeling *et al.*, 2003). La interacción del Co con otros metales, depende principalmente de la concentración de los metales usados. Por ejemplo, altos niveles de Co^{2+} inducen una deficiencia de Fe en las plantas y suprime la toma de Cd en las raíces. Además, actúa de manera sinérgica con metales como el Zn, Cr y Sn. En algunos casos, el Ni puede sobrepasar el efecto inhibitorio del Co, mostrando una relación antagónica entre ambos elementos (Ince *et al.*, 1999; Palit *et al.*, 1994). La caracterización de mutantes de *Arabidopsis* con fenotipos con un perfil de Mn alterado ha permitido la identificación de componentes importantes en la homeostasis del metal (Cailliatte *et al.*, 2010). Muchas mutantes con altos niveles de Mn también muestran concentraciones elevadas de Co, sugiriendo un papel compartido entre estos metales. Se han identificado 12 especies hiperacumuladoras de Mn con una habilidad de acumular y tolerar más de 10000 μg de Mn basado en peso seco y la mayoría son arbustos o especies arbóreas creciendo en regiones subtropicales (Bidwell *et al.*, 2002; Krämer, 2010; Xue *et al.*, 2004). La homeostasis de Mn en *Arabidopsis thaliana* parece deberse a la participación de diferentes transportadores. Por ejemplo, los transportadores de la familia ZIP y NRAMP regulan el transporte del elemento hacia el citosol. El transportador AtMTP11 (CDF) permite transportar el exceso de Mn hacia un compartimiento prevacuolar (Delhaize *et al.*, 2007; Peiter *et al.*, 2007). En relación al Pb, este no es reconocido como un elemento esencial para las plantas y por tanto no tienen canales propios para su captación a partir del sustrato. Diversos estudios

han mostrado que el Pb es absorbido y permanece en las raíces, siendo la primera barrera para la translocación del metal hacia la parte aérea. Una vez dentro de las raíces la mayor parte del Pb se encuentra unida a sitios intercambiables de iones en las paredes celulares (Blaylock y Huang, 2000). El Pb al igual que otros elementos metálicos es complejado por fitoquelatinas. En la especie *Sesbania drummondii* el Pb es transportado a los tallos y a las hojas en complejos similares a Pb-acetato, Pb-nitrato y Pb-sulfuro, y hasta la fecha es la única especie que se ha caracterizado por una acumulación mayor al 1% de Pb en peso seco en el tallo después de una exposición a una solución hidropónica contaminada con Pb (Sahi *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2004).

En nuestro país hay una intensa actividad minera y metalúrgica que ha generado grandes cantidades de residuos sólidos y acuosos. El manejo inadecuado de los efluentes metálicos ha tenido como consecuencia la movilización de metales pesados hacia otros sistemas, causando así contaminación de aire, suelos y agua. Además, la liberación de aguas residuales con metales pesados resulta en una gran pérdida de metales económicamente valiosos tales como Ni, Mn, Co y Pb. En cuanto a protección ambiental y salud humana, por ejemplo en el municipio de Molango, México, depósitos naturales de Mn han sido extraídos y procesados desde 1960. Estas actividades mineras han causado un gran deterioro a lo largo del tiempo en las poblaciones aledañas, las cuales ya manifiestan problemas de contaminación por Mn así como una baja productividad de sus suelos atribuidos en gran parte a emisiones de gases y polvo provenientes de las minas (Aldape *et al.*, 1999; Juárez-Santillán *et al.*, 2010; Riojas-Rodríguez *et al.*, 2010). Por otro lado, la basura electrónica es química y físicamente distinta de otras formas de residuos tales como la basura municipal o industrial; los desechos de productos electrónicos contienen metales pesados valiosos y otros componentes que requieren de un manejo especial, así como de métodos de reciclaje para evitar la contaminación ambiental y sus efectos adversos en la salud humana. A través del reciclaje se pueden recuperar componentes reusables y materiales base, tales como el Cu, Mn, Co y Ni entre otros metales de alto valor en el mercado. La falta de instalaciones así como los altos costos de operación, provocan que la tendencia sea baja hacia el reciclaje en dichos residuos. En su lugar, estos son usados para su disposición final en rellenos sanitarios, o exportados de países desarrollados a países sub-desarrollados o en vías de desarrollo, donde son reciclados usando técnicas inadecuadas las cuales generan subproductos mucho más tóxicos para la salud del ser humano y con mayor potencialidad de daño para el ambiente.

8. Conclusiones

En general, el objetivo de este trabajo fue incrementar el conocimiento sobre el uso de las especies hiperacumuladoras de metales pesados y proponer el desarrollo de una estrategia de extracción de Ni a partir de efluentes contaminados mediante el uso de cultivos de raíces transformadas o “raíces pilosas” de la especie hiperacumuladora *A. lesbiacum*. El uso de estos cultivos, cumpliría por un lado con una tolerancia a altas concentraciones de Ni en el medio (prerrequisito clave para la fitorremediación), y por el otro, con características inherentes a las raíces pilosas tales como su alta tasa de crecimiento, gran generación de biomasa y una gran área de superficie de contacto. Los resultados de este proyecto, muestran que los cultivos de raíces pilosas son una herramienta útil para estudiar la absorción e hiperacumulación de metales, esencial para el desarrollo y la implementación de estrategias de fitorremediación basadas en biotecnología. Los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* mantienen la capacidad de acumular Ni con respecto a la planta completa de la misma especie, mientras que los cultivos de raíces pilosas de *A. montanum* disminuyen su capacidad de acumular Ni con respecto a la planta completa de la misma especie. Se observa entonces que los tejidos de las raíces pilosas de la especie hiperacumuladora mantienen una capacidad alta de acumulación de Ni y aún cuando la capacidad total de concentrar el metal se ve reducida en las raíces pilosas con respecto a las plantas completas, la capacidad alta de crecimiento de las raíces pilosas permitirían acumular una cantidad de biomasa a un nivel mucho más alto que aquel logrado por la planta completa, generando un organismo con gran potencial de uso en tecnologías de fitorremediación y recuperación de Ni. La exposición de los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* a concentraciones fitotóxicas de Ni no inhibe su crecimiento, además, siguiendo los criterios de una acumulación $>1000 \mu\text{g Ni g}^{-1}$, y coeficientes de bioacumulación mayores a 1.0, se puede observar que los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* pueden lograr la hiperacumulación de Ni sin la presencia de la parte aérea. Los resultados también muestran una absorción efectiva e hiperacumulación de Ni en cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* a cortos periodos de exposición. Además, la hiperacumulación de Ni se puede lograr aún en presencia de metales tales como el Mn, Co y Pb, característica altamente favorable si se toma en cuenta que una gran mayoría de efluentes contaminados tiene presente más de un metal. Cabe resaltar que los cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* también pueden absorber e hiperacumular Co y Pb, y acumular altos contenidos de Mn.

Existen efluentes residuales o cuerpos de agua que contienen metales pesados los cuales son contaminantes potenciales si no son tratados adecuadamente. Por otro lado, dichos efluentes pueden ser una fuente secundaria importante de metales de interés económico tales como el Ni. La bioextracción de Ni a partir de estas fuentes secundarias usando las raíces pilosas de la planta hiperacumuladora *A. lesbiacum*, cultivadas a gran escala, podría ser una estrategia efectiva e importante. No sólo en términos de reciclaje, sino también en términos de mitigación de la contaminación, al reducir y/o prevenir la descarga de metales pesados que pueden causar un grave deterioro ambiental. Los resultados de este proyecto de tesis pueden ser útiles, además, para determinar la aplicación potencial de las raíces pilosas de *A. lesbiacum*, las cuales pueden acumular de manera simultánea varios metales pesados, en el desarrollo de una estrategia de fitorremediación de aguas residuales contaminadas con una mezcla de elementos. La mayor parte de la investigación ha sido llevada a cabo a una escala de laboratorio, bajo condiciones relativamente controladas y por periodos de tiempo cortos, el verdadero potencial de la bioextracción de metales pesados está aún por ser investigado. Se necesitan de experimentos más intensivos bajo condiciones de campo, durante periodos más prolongados de tiempo y a una escala comercial. Para lograr resultados óptimos en la aplicación de las raíces pilosas de especies vegetales hiperacumuladoras de metales, se requiere de esfuerzos interdisciplinarios que combinen a la Biología Vegetal, Ingeniería Genética, Biotecnología, Química e Ingeniería Ambiental, entre otros, para en un futuro mediano desarrollar una tecnología eficiente de fitorremediación basada en estos cultivos.

9. Referencias

Aksu Z., Acikel U., Kabasakal E. 2002. **Equilibrium modelling of individual and simultaneous biosorption of chromium(VI) and nickel(II) onto dried activated sludge.** Water Research. **36**, 3063–3073.

Aldape F., Hernández-Méndez B., Flores M.J. 1999. **Manganese survey in airborne particulate matter from a mining area at Hidalgo State.** Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. **150**, 363–369.

Allen G.C., Flores-Vergara M.A., Krasnyanski S., Kumar S., Thompson W.F. 2006. **A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide.** Nature Protocols. **1**, 2320-2325.

An Y.J., Kim Y.M., Kwon T.I., Jeong S.W. 2004. **Combined effect of copper, cadmium and lead upon *Cucumis sativus* growth and bioaccumulation.** Science of the Total Environment. **326**, 85-93.

Araújo G.C.L., Gonzalez M.H., Ferreira A.G., Nogueira A.R.A., Nóbrega J.A. 2002. **Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials.** Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. **57**, 2121-2132.

Arnetoli M., Vooijs R., Ten Bookum W., Galardi F., Gonnelli C., Gabbrielli r., Schat H., Verkleij J.A.C. 2008. **Arsenate tolerance in *Silene paradoxa* does not rely on phytochelatin-dependent sequestration.** Environmental Pollution. **152**, 585-591.

Baker A.J.M., Brooks R.R. 1989. **Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry.** Biorecovery. **1**, 81-126.

Baker A. J. M., Walker P.L. 1990. **Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants.** En: Shaw A.J. Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects. CRC Press. Boca Raton. 155-177.

Baker A.J.M., McGrath S.P., Sidoli C.M.D., Reeves R.D. 1994. **The possibility of in-situ heavy-metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants.** Resources Conservation Recycling. **11**, 41-49.

Baker A.J.M., McGrath S.P., Reeves R.D., Smith J.A.C. 2000. **Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils.** En: Terry N., Banuelos G. (Eds.). Phytoremediation of contaminated soil and water. Lewis Publishers, Boca Raton, Fl. pp. 85-107.

Barin J.S., Bartz F.R., Dressler V.L., Paniz J.N.G., Flores E.M.M. 2008. **Microwave-induced combustion coupled to Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry for determination of cadmium and lead in botanical samples.** Analytical Chemistry. **80**, 9369-9374.

Baxter I.R., Vitek O., Lahner B., Muthukumar B., Borgui M., Morrisey J., Guerinot M.L., Salt D.E. 2008. **The leaf ionome as a multivariable system to detect a plant's physiological status.** Proceedings of the National Academy of Sciences USA. **105**, 12081-12086.

Benguella B., Benaissa H. 2002. **Effect of competing cations on cadmium biosorption by chitin.** Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. **201**, 143–150.

Benini S., Rypniewski W.R., Wilson K.S., Miletta S., Ciurli S., Mangani S. 1999. **A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels.** Structure. **7**, 205-216.

Bidwell S.D., Woodrow I.E., Batianoff G.N., Sommer-Knudsen J. 2002. **Hyperaccumulation of manganese in the rainforest tree *Austromyrtus bidwillii* (Myrtaceae) from Queensland, Australia.** Functional Plant Biology. **29**, 899-905.

Blaylock M.J., Huang J.W. **Phytoextraction of metals.** 2000. En: Raskin I., Ensley B.D. (Eds.). Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment. New York. John Wiley. p. 53-71.

Bleeker P.M., Hakvoort H.W.J., Blik M., Souer E., Schat H. 2006. **Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate tolerant *Holcus lanatus*.** Plant Journal. **45**, 917-929.

Bocca B., Conti M.E., Pino A., Mattei D., Forte G., Alimonti A. 2007. **Simple, fast, and low-contamination microwave-assisted digestion procedures for the determination of chemical elements in biological and environmental matrices by sector field ICP-MS.** International Journal of Environmental Analytical Chemistry. **87**, 1111-1123.

Bonhomme V., Laurain-Mattar D., Fliniaux M.A. 2000. **Effects of the *rol C* gene on hairy root: induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna*.** Journal of Natural Products. **63**, 1249-1252.

Boominathan R., Doran P.M. 2002. **Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator *Alyssum bertolonii*.** New Phytologist. **156**, 205-215.

Boominathan R., Doran P.M. 2003. **Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*.** Biotechnology and Bioengineering. **83**, 158-167.

Boominathan R., Saha-Chaudhury N.M., Sahajwalla V., Doran P.M. 2004. **Production of nickel bio-ore from hyperaccumulator plant biomass: applications in phytomining.** Biotechnology and Bioengineering. **86**, 243–250.

Brooks R.R., Lee J., Reeves R.D., Jaffrè T. 1977. **Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants.** Journal of Geochemical Exploration. **7**, 49-57.

Brooks R.R., Robinson B.H. 1998. **The potential use of hyperaccumulators and other plants for phytomining.** En: Brooks R.R. (Ed.). Plants that hyperaccumulate heavy metals

– their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytomining. CAB International, New York.

Cailliatte R., Schikora A., Briat J.F., Mari S., Curie C. 2010. **High-Affinity Manganese Uptake by the Metal Transporter NRAMP1 is Essential for *Arabidopsis* Growth in Low Manganese Conditions.** *The Plant Cell*. **22**, 904-917.

Callahan D.L., Baker A.J.M., Kolev S.D., Wedd A.G. 2006. **Metal ion ligands in hyperaccumulating plants.** *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. **11**, 2-12.

Callahan D.L., Kolev S.D., O'Hair R.A.J., Salt D.E., Baker A.J.M. 2007. **Relationships of nicotianamine and other amino acids with nickel, zinc and iron in *Thlaspi* hyperaccumulators.** *New Phytologist*. **176**, 836-848.

Cardarelli M., Mariotti D., Pomponi M., Spanò L., Capone I., Constantino P. 1987. ***Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype.** *Molecular and General Genetics*. **209**, 475-480.

Castro Díaz J., Díaz Arías M.L. 2004. **La contaminación por pilas y baterías en México.** Instituto Nacional de Ecología. Dirección General de Investigación sobre la Contaminación Urbana, Regional y Global. México D.F.

Chakraborty P., Gopalapillai Y., Murimboh J., Fafous I.I., Chakrabarti C.L. 2006. **Kinetic speciation of nickel in mining and municipal effluents.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **386**, 1803–1813.

Chaney R.L. 1983. **Plant uptake of inorganic waste.** En: Parr J.F., Marsh P.B., Kla J.M. (Eds.). *Land treatment of hazardous wastes.* Park Ridge. Noyes Data Corporation. pp. 50-76.

Chapin R.E. 2004. **Nature is complex: Our orchestra seats at the most wonderful show on earth.** *Toxicological Sciences*. **80**, 1–2.

Chen Z., Watanabe T., Shinano T., Okazaki K., Osaki M., Shinano T. 2009. **Rapid characterization of plant mutants with an altered ion profile: a case study using *Lotus japonicus*.** *New Phytologist*. **181**, 795-801.

Cheung K.H., Gu J.D. 2007. **Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review.** *International Biodegradation & Biodegradation*. **59**, 8-15.

Chiang H.C., Lo J.C., Yeh K.C. 2006. **Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*: a genomic survey with cDNA microarray.** *Environmental Science & Technology*. **40**, 6792–6798.

Chong K.H., Volesky B. 1995. **Description of two-metal biosorption equilibria by Langmuir-type models.** *Biotechnology and Bioengineering*. **47**, 451-460.

Christey M.C. 2001. **Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants.** *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. **37**, 687-700.

- Clemens, S. 2001. **Molecular mechanisms of plant metal homeostasis**. *Planta*. **212**, 475-486.
- Cobbett C.S., May M.J., Howden R., Rolls B. 1998. **The glutathione deficient cadmium-sensitive mutant *cad2-1* of *Arabidopsis thaliana* is deficient in**. *Plant Journal*. **16**, 73-78.
- Cobbett C., Goldsbrough P. 2002. **Phytochelatin and metallothioneins: role in heavy metal detoxification and homeostasis**. *Annual Review of Plant Biology*. **53**, 159-182.
- Costa M., Yan Y., Zhao D., Salnikow K. 2003. **Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis: gene silencing by nickel delivery to the nucleus and gene activation/inactivation by nickel-induced cell signalling**. *Journal of Environmental Monitoring*. **5**, 222-223.
- Courbot m., Willems G., Motte P., Arvidsson S., Roosens N., Saumitou-Laprade P., Verbruggen N. 2007. **A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with HMA4, a gene encoding a heavy metal ATPase**. *Plant Physiology*. **144**, 1052-1065.
- Davila J.S., Matos C.M., Cavalcanti M.R. 1992. **Heavy metals removal from wastewater by using activated peat**. *Water Science & Technology*. **26**, 2309-2312.
- Duffus J.H. 2002. **“Heavy metals” – A meaningless term?**. *Pure and Applied Chemistry*. **74**, 793-807.
- Duruibe J.O., Ogwuegbu M.O.C., Egwurugwu J.N. 2007. **Heavy metal pollution and human biotoxic effects**. *International Journal of Physical Sciences*. **2**, 112-118.
- Dushenkov V., Nanda Kumar P.B.A., Motto H., Raskin I. 1995. **Rhizofiltration: The use of plants to remove heavy metals from aqueous streams**. *Environmental Science & Technology*. **29**, 1239-1245.
- Eapen S., Suseelan K.N., Tivarekar S., Kotwal S.A., Mitra R. 2003. **Potential for rhizofiltration of uranium using hairy root cultures of *Brassica juncea* and *Chenopodium amaranticolor***. *Environmental Research*. **91**, 127-133.
- Eapen S., Singh S., D'Souza S.F. 2007. **Phytoremediation of metals and radionuclides**. En: Singh S.N., Tripathi R.D. (Eds). *Environmental Bioremediation Technologies*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 189-209.
- Ernst W.H.O. 2005. **Phytoextraction of mine wastes – Options and impossibilities**. *Chemie der Erde-Geochemistry*. **65**, 29-42.
- Ernst W.H.O., Nelissen H.J.M., Ten Bookum W.M. 2000. **Combination toxicology of metal-enriched soils: physiological responses of a Zn- and Cd-resistant ecotype of *Silene vulgaris* on polymetallic soils**. *Environmental and Experimental Botany*. **47**, 55-71.
- Espinosa E., Armienta M.A., Cruz O., Aguayo A., Cenicerros N. 2009. **Geochemical distribution of arsenic, cadmium, lead and zinc in river sediments affected by tailings in Zimapán, a historical polymetallic mining zone of México**. *Environmental Geology*. **58**, 1467-1477.

Estruch J.J., Schell J., Spena A. 1991. **The protein encoded by *rolB* plant oncogene hydrolyses indole glucosides.** The EMBO Journal. **10**, 3125-3128.

Estruch J.J., Parets-Soler A., Schmülling T., Spena A. 1991. **Cytosolic localization in transgenic plants of the *rolC* peptide from *Agrobacterium rhizogenes*.** Plant Molecular Biology. **17**, 547-550.

Flores E.H., Vivanco M.J., Loyola-Vargas M.V. 1999. **'Radicle' biochemistry: the biology of root-specific metabolism.** Trends in Plant Science. **4**, 220-226.

Franco-Hernández M.O., Vásquez-Murrieta M.S., Patiño-Siciliano A., Dendooven L. 2010. **Heavy metals concentration in plants growing on mine tailings in Central Mexico.** Bioresource Technology. **101**, 3864-3869.

Freeman J.L., Persans M.W., Nieman K., Albrecht C., Peer W., Pickering I.J., Salt D.E. 2004. **Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators.** The Plant Cell. **16**, 2176-2191.

Freyermuth S.K., Bacanamwo M., Polacco J.C. 2000. **The soybean *Eu3* gene encodes an Ni-binding protein necessary for urease activity.** The Plant Journal. **21**, 53-60.

Gavilán A.G., Rojas L.B., Barrera J.C. 2009. **Las pilas en México: un diagnóstico ambiental.** INE. SEMARNAT. México, D.F.

Gerendás J., Polacco J.C., Freyermuth S.K., Sattelmacher B. 1999. **Significance of nickel for plant growth and metabolism.** Journal of Plant Nutrition and Soil Science. **162**, 241-256.

Grifferty A., Barrington S., 2000. **Zinc uptake by young wheat plants under two transpiration regimes.** Journal of Environmental Quality. **29**, 443-446.

Grill E., Löffler S., Winnacker E.L. Zenk M.H. 1989. **Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase).** Proceedings of the National Academy of Sciences USA. **86**, 6838-6842.

Guillon S., Trémouillaux-Guiller J., Pati P.K., Rideau M., Gantet P. 2006. **Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era.** Trends in Biotechnology. **24**, 403-409.

Hall J.L. 2002. **Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance.** Journal of Experimental Botany. **53**, 1-11.

Hammond J.P., Bowen H.C., White P.J., Mills V., Pyke K.A., Baker A.J.M., Whiting S.N., May S.T., Broadley M.R. 2006. **A comparison of the *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi arvense* shoot transcriptomes.** New Phytologist. **170**, 239-260.

Hanikenne M., Talke I.N., Haydon M.J., Lanz C., Nolte A., Motte P., Kroymann J., Weigel D., Krämer U. 2008. **Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of *HMA4*.** Nature. **453**, 391-395.

Hansen G., Larribe M., Vaubert D., Tempé J., Biermann B.J., Montoya A.L., Chilton MD., Brevet J. 1991. ***Agrobacterium rhizogenes* pRi8196 T-DNA: Mapping and DNA sequence of functions involved in mannopine synthesis and hairy root differentiation.** Proceedings of the National Academy of Sciences USA. **88**, 7763-7767.

Hassinen V.H., Tervahauta A.I., Hamilmaa P., Plessl M., Peraniemi S., Schat H., Aarts M.G.M., Servomaa K., Karenlampi S.O. 2007. **Isolation of ZN-responsive genes from two accessions of the hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens*.** Planta. **225**, 977-989.

Hebborn C.A., Laursen K.H., Ladegaard A.H., Schmidt S.B., Pedas P., Bruhn D., Schjoerring J.K., Wulfsohn D., Husted S. 2009. **Latent manganese deficiency increases transpiration in barley (*Hordeum vulgare*).** Physiologia Plantarum. **135**, 307-316.

Hennebel T., De Gussemme B., Boon N., Verstraete. 2008. **Biogenic metals in advanced water treatment.** Trends in Biotechnology. **27**, 90-98.

Hoffmann A.W., Poorter H. 2002. **Avoiding Bias in Calculations of Relative Growth Rate.** Annals of Botany. **80**, 37- 42.

Homer F.A., Morrison R.S., Brooks R.R., Clemens J., Reeves R.D. 1991. **Comparative studies of nickel, cobalt and copper uptake by some nickel hyperaccumulators of the genus *Alyssum*.** Plant Soil. **138**, 195-205.

Hseu ZY. 2004. **Evaluating heavy metal contents in nine composts using four digestion methods.** Bioresource Technology. **95**, 53-59.

Hu ZB., Du M. 2006. **Hairy root and its application in plant genetic engineering.** Journal of Integrative Plant Biology. **48**, 121-127.

Huie C.W. 2002. **A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants.** Analytical and Bioanalytical Chemistry. **373**, 23-30.

Hussain D., Haydon M.J., Wang Y., Wong E., Sherson S.M., Young J., Camakaris J., Harper J.F., Cobbett C.S. 2004. **P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*.** Plant Cell. **16**, 1327-1339.

Huang J.W., Cunningham S.D. 1996. **Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation.** New Phytologist. **134**, 75-84.

Ince N.H., Dirilgen N., Apikyan I.G., Tezcanli G., Üstün B. 1999. **Assessment of toxic interactions of heavy metals in binary mixtures: a statistical approach.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology. **36**, 365-372.

Ingle R.A., Mugford S.T., Rees J.D., Campbell M.M., Smith A.C. 2005. **Constitutively high expression of the histidina biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants.** Plant Cell. **17**, 1-18.

Jabeen R., Ahmad A., Iqbal M. 2009. **Phytoremediation of Heavy Metals: Physiological and Molecular Mechanisms.** The Botanical Review. **75**, 339–364.

January M.C., Cutright T.J., Keulen H.V., Wei R. 2008. **Hydroponic phytoremediation of Cd, Cr, Ni, As, and Fe: Can *Helianthus annuus* hyperaccumulate multiple heavy metals?**. Chemosphere. **70**, 531-537.

Juárez-Santillán L.F., Lucho-Constantino C.A., Vázquez-Rodríguez G.A., Cerón-Ubilla N.M., Beltrán-Hernández R.I. 2010. **Manganese accumulation in plants of the mining zone of Hidalgo, Mexico**. Bioresource Technology. **101**, 5836-5841.

Kapoor A., Viraraghavan T. 1995. **Fungal biosorption-an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review**. Bioresource Technology. **53**, 195-206.

Keller C., Hammer D. 2004. **Metal availability and soil toxicity after repeated croppings of *Thlaspi caerulescens* in metal contaminated soils**. Environmental Pollution. **131**, 243-254.

Kerkeb L., Krämer U. 2003. **The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea***. Plant Physiology. **131**, 716-724.

Keeling S.M., Stewart R.B., Anderson C.W.N., Robinson B.H. 2003. **Nickel and cobalt phytoextraction by the hyperaccumulator *Berkheya coddii*: Implications for polymetallic phytomining and phytoremediation**. International Journal of Phytoremediation. **5**, 235-244.

Kim S., Takahashi M., Higuchi K., Tsunoda K., Nakanishi H., Yoshimura E., Mori S., Nishizawa N.K. 2005. **Increased nicotianamine biosynthesis confers enhanced tolerance of high levels of metals, in particular Nickel, to plants**. Plant Cell Physiology. **46**, 1809-1818.

Krachler M., Mohl C., Emons H., Shotyk W. 2002. **Influence of digestion procedures on the determination of rare earth elements in peat and plant samples by USN-ICP-MS**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry. **17**, 844-851.

Krämer Ute. 2010. **Metal hyperaccumulation in plants**. Annual Review of Plant Biology. **61**, 517-534.

Krämer U., Cotter-Howells J.D., Charnock J.M., Baker A.J.M., Smith J.A.C. 1996. **Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel**. Nature. **379**, 635-638.

Krämer U. 2003. **Phytoremediation to phytochelatin – plant trace metal homeostasis**. New Phytologist. **159**, 453-459.

Krämer U., Talke I.N., Hanikenne M. 2007. **Transition metal transport**. FEBS Letters. **581**, 2263-2272.

Kuiper I., Lagendijk E.L., Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.J. 2004. **Rhizoremediation: A Beneficial Plant-Microbe Interaction**. Molecular Plant-Microbe Interactions. **17**, 6-15.

Küpfer H., Kroneck P.M.H. 2007. **Nickel in the environment and its role in the metabolism of plants and cyanobacteria**. En: Sigel A., Sigel H., Sigel R.K.O. (Eds.). Metal Ions in Life Sciences. Vol. 2. Wiley, New York., pp. 31-62.

Kurniawan T.A., Chan G.Y.S., Lo W.H., Leon S.B.A.T. 2006. **Comparisons of low- cost adsorbents for treating wastewaters laden with heavy metals.** Science of the Total Environment. **366**, 409-426.

Lassat M.M., Baker A.J.M., Kochian L.V. 1998. **Altered Zn compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn absorption into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*.** Plant Physiology. **118**, 875-883.

Li Y.M., Chaney R.L., Brewer E.P., Angle J.S., Nelkin J. 2003. **Phytoextraction on Nickel and Cobalt by Hyperaccumulator *Alyssum* Species Grown on Metal-Contaminated Soils.** Environmental Science & Technology. **37**, 1463-1468.

Li L., Kaplan J. 1998. **Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the expression of transporters with a broad transition metal specificity.** The Journal of Biological Chemistry. **273**, 22181-22187.

Liu C., Bai R., Ly Q.S. 2008. **Selective removal of copper and lead ions by diethylenetriamine-functionalized adsorbent: behaviors and mechanisms.** Water Research. **42**, 1511-1522.

Liu D.H., Jiang W.S., Liu C.J., Xin C.H., Hou W.Q. 2000. **Uptake and accumulation of lead by roots, hypocotyls and shoots of Indian mustard [*Brassica juncea* (L.)].** Bioresource Technology. **71**, 273-277.

Liu D., Zou J., Meng Q., Zou J., Jiang W. 2009. **Uptake and accumulation and oxidative stress in garlic (*Allium sativum* L.) under lead phytotoxicity.** Ecotoxicology. **18**, 134-143.

Lippo H., Jauhiainen T., Perämäki P. 1997. **Comparison of digestion methods for the determination of total mercury in environmental samples by Flow Injection CV-AAS.** Atomic Spectroscopy. **18**, 102-108.

Lu H., Shi X., Costa M., Huang C. 2005. **Carcinogenic effect of nickel compounds.** Molecular and Cellular Biochemistry. **279**, 45-67.

Macek T., Kotrba P., Suchova M., Skacel F., Demnerova K., Ruml T. 1994. **Accumulation of cadmium by hairy-root cultures of *Solanum nigrum*.** Biotechnology Letters. **16**, 621-624.

MacFarlane G.R., Burchett M.D. 2002. **Toxicity, growth and accumulation relationships of copper, lead and zinc in the grey mangrove *Avicennia marina* (Forsk.).** Marine Environmental Research. **54**, 65-84.

Maestri E., Marmioli M., Visioli G., Marmioli N. 2010. **Metal tolerance and hyperaccumulation: costs and trade-offs between traits and environment.** Environmental and Experimental Botany. **68**, 1-13.

Malik M., Chaney R.L., Brewer E. P., Angle J.S. 2000. **Phytoextraction of soil cobalt using hyperaccumulators plants.** International Journal of Phytoremediation. **2**, 319-329.

- Marchiol L., Assolari S., Sacco P., Zerbi G. 2004. **Phytoextraction of heavy metals by canola (*Brassica napus*) and radish (*Raphanus sativus*) grown on multicontaminated soil.** Environmental Pollution. **132**, 21-27.
- Marschner H. 1995. **Mineral nutrition of higher plants.** 2nd ed. London, UK. Academic Press.
- Martínez M., Bernal P., Almela C., Vélez D., García-Agustín P., Serrano R., Navarro-Aviño J. 2006. **An engineered plant that accumulates higher levels of heavy metals than *Thlaspi caerulescens*, with yields of 100 times more biomass in mine soils.** Chemosphere. **64**, 478-485.
- McAfee B.J., White E.E., Pelcher L.E., Lapp M.S. 1993. **Root induction in pine (*Pinus*) and larch (*Larix*) spp. using *Agrobacterium rhizogenes*.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture. **34**, 53-62.
- McGrath S.P. Dunham S.J. Correll R.L. 1999. **Potential for Phytoextraction of Zinc and Cadmium from Soils Using Hyperaccumulator Plants.** En: Terry N., Bañuelos G.S. (Eds.) Phytoremediation of contaminated soil and water. Lewis, Boca Raton, FL. pp 109–128.
- McGrath S.P. y Zhao F.J. 2003. **Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils.** Current Opinion in Biotechnology. **14**, 277-282.
- Meagher R.B., 2000. **Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants.** Current Opinion in Plant Biology. **3**, 153-162.
- Meharg A.A. 2002. **Arsenic and old plants.** New Phytologist. **156**, 1-4.
- Mengoni A., Baker J.M., Bazzicalupo M., Reeves R.D., Adigüzel N., Chianni E., Galardi F., Gabbrielli R., Gonnelli C. 2003. **Evolutionary dynamics of nickel hyperaccumulation in *Alyssum* revealed by its nrDNA analysis.** New Phytologist. **159**, 691-699.
- Meyer A., Tempe J., Constantino P. 2000. **Hairy root: a molecular overview functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes.** En: Stacey G., Keen N. (Eds.). Plant-microbe interactions. Vol 5. APS Press. St. Paul. Minnesota. pp. 93-139.
- Micó C., Li. H.F., Zhao F.J., McGrath S.P. 2008. **Use of Co especiation and soil properties to explain variation in Co toxicity to root growth to barley (*Hordeum vulgare* L.) in different soils.** Environmental Pollution. **156**, 883-890.
- Mireles A., Solís C., Andrade E., Lagunas-Solar M., Piña C., Flocchini R.G. 2004. **Heavy metal accumulation in plants and soil irrigated with wastewater from Mexico City.** Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B. **219-220**, 187-190.
- Mohan D., Singh P.K. 2002. **Single- and multi-component adsorption of cadmium and zinc using activated carbon derived from bagasse—an agricultural waste.** Water Research. **36**, 2304–2318.

Montargès-Pelletier E., Chardot V., Echevarria G., Michot L.J., Bauer A., Morel J.L. 2008. **Identification of nickel chelators in three hyperaccumulating plants: An X-ray spectroscopy study.** *Phytochemistry*. **69**, 1695-1709.

Moriuchi H., Okamoto C., Nishihama R., Yamashita I., Machida Y., Tanaka N. 2004. **Nuclear localization and interaction of RolB with plant 14-3-3 proteins correlates with induction of adventitious roots by the oncogene *rolB*.** *The Plant Journal*. **38**, 260-275.

Mounicou S., Shah M., Meija J., Caruso J.A., Vonderheide A.P., Shann J. 2006. **Localization and speciation of selenium and mercury in *Brassica juncea* – implications for Se-Hg antagonism.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **21**, 404-412.

Naciones Unidas. 2007. <http://esa.un.org/unpp/>

Nedelkoska T.V., Doran P.M. 2000. **Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens*.** *Biotechnology Bioengineering*. **67**, 607-615.

Nedelkoska T.V., Doran P.M. 2000. **Characteristics of heavy metal uptake by plant species with potential for phytoremediation and phytomining.** *Minerals Engineering*. **13**, 549-561.

Nedelkoska T.V., Doran P.M. 2001. **Hyperaccumulation of nickel by hairy roots of *Alyssum* species: comparison with whole regenerated plants.** *Biotechnology Progress*. **17**, 752-759.

Nilsson O., Moritz T., Imbault N., Sandberg G., Olsson O. 1993. **Hormonal characterization of transgenic Tobacco plants expressing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA.** *Plant Physiology*. **102**, 363-371.

Nilsson O., Olsson O. 1997. **Getting to the root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes rol* genes in the formation of hairy roots.** *Physiologia Plantarum*. **100**, 463-473.

Nriagu J.O., Pacyna J.M. 1988. **Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals.** *Nature*. **333**, 134 – 139.

OhioEpa. 2002. **Nickel and Nickel Compounds.** State of Ohio Environmental Protection Agency No. 96.

Oliva S.R., Valdés B. 2004. **Influence of washing on metal concentrations in leaf tissue.** *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. **35**, 1543-1552.

Oliver M.A. 1997. **Soil and human health: a review.** *European Journal of Soil Science*. **48**, 573-592.

Oller A. R., Costa M., Oberdörster G. 1997. **Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds.** *Toxicology and Applied Pharmacology*. **143**, 152-166.

Ono N.N., Tian L. 2011. **The multiplicity of hairy root cultures: Prolific possibilities.** *Plant Science*. **180**, 439-446.

- Pacyna J.M., Pacyna E.G. 2001. **An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide.** Environmental Reviews. **9**, 269–298.
- Pagnanelli M., Trifoni M., Beolchini F. 2001. **Equilibrium biosorption studies in single and multi-metal systems.** Process Biochemistry. **37**, 115–124.
- Palit S., Sharma A., Talukder G. 1994. **Effect of cobalt on plants.** Botanical Review. **60**, 149-181.
- Palmer C.M., Guerinot M.L. 2009. **Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants.** Nature Chemical Biology. **5**, 333-340.
- Paschke M.W., Valdecantos A., Redente E.F. 2005. **Manganese toxicity thresholds for restoration grass species.** Environmental Pollution. **135**, 313-322.
- Pennella M.A., Giedroc D.P. 2005. **Structural determinants of metal selectivity in prokaryotic metal-responsive transcriptional regulators.** Biometals. **18**, 413-428.
- Persans M.W., Nieman K., Salt D.E. 2001. **Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*.** Proceedings of the National Academy of Sciences USA. **98**, 9995-10000.
- Pilon-Smits E., Pilon M. 2000. **Breeding mercury-breathing plants for environmental cleanup.** Trends in Plant Science. **5**, 235-236.
- Pitzschke A., Hirt H. 2010. **New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation.** The EMBO Journal. **29**, 1021-1032.
- Podar D., Ramsey M.H., Hutchings M.J. 2004. **Effect of cadmium, zinc and substrate heterogeneity on yield, shoot metal concentration and metal uptake by *Brassica juncea*: implications for human health risk assessment and phytoremediation.** New Phytologist. **163**, 313-324.
- Puig S., Andrés-Colás N., García-Molina A., Peñarrubia L. 2007. **Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications.** Plant, Cell and Environment. **30**, 271-290.
- Quevauviller P., Imbert J.L., Ollé M. 1993. **Evaluation of the use of microwave oven systems for the digestion of environmental samples.** Microchimica Acta. **112**, 147-154.
- Reeves R.D. 1992. **Hyperaccumulation of nickel by serpentine plants.** En: Proctor J., Baker A.J.M., y Reeves R.D. (Eds.). The vegetation of ultramafic (Serpentine) soils. Intercept LTD., Andover, U.K. pp. 253-277.
- Reeves R.D., Baker A.J.M. 2000. **Metal-accumulating plants.** En: Raskin I., Ensley B.D. (Eds.). Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment. New York: John Wiley & Sons. pp. 193-229.
- Reeves R.D. 2003. **Tropical hyperaccumulators of metals and their potential for phytoextraction.** Plant and Soil. **249**, 57-65.

Richau K.H., Kozhevnikova A.D., Seregin I.V., Vooijs R., Koevoets P.L.M., Smith J.A.C., Ivanov V.B., Schat H. 2009. **Chelation by histidin inhibits the vacuolar sequestration of nickel in roots of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens***. *New Phytologist*. **183**, 106-116.

Riojas-Rodríguez H., Solís-Vivanco R., Schilman A., Montes S., Rodríguez S., Ríos C., Rodríguez-Agudelo Y. 2010. **Intellectual Function in Mexican Children Living in a Mining Area and Environmentally Exposed to Manganese**. *Environmental Health Perspectives*. **118**, 1465-1470.

Robinson B.H., Fernández J.E., Madejón P., Marañón T., Murillo J.M., Green S., Clothier B. 2003. **Phytoextraction: an assessment of biogeochemical and economic viability**. *Plant and Soil*. **249**, 117-125.

Rodushkin I., Ruth T., Huhtasaari A. 1999. **Comparison of two digestion methods for elemental determinations in plant material by ICP techniques**. *Analytica Chimica Acta*. **378**, 191-200.

Román-Moguel G.J. 2007. **Diagnóstico sobre la generación de basura electrónica en México**. Instituto Nacional de Ecología. Centro Internacional de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo.

Sahi S.V., Bryant N.L., Sharma N.C., Singh S.R. 2002. **Characterization of a lead hyperaccumulator shrub, *Sesbania drummondii***. *Environmental Science & Technology*. **36**, 4676-4680.

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

Salt D.E., Prince R.C., Baker A.J.M., Raskin I., Pickering I.J. 1999. **Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy**. *Environmental Science & Technology*. **33**, 713-717.

Salt D.E., Prince R.C., Pickering I.J. 2002. **Chemical speciation of accumulated metals in plants: evidence from X-ray absorption spectroscopy**. *Microchemical Journal*. **71**, 255-259.

Santos-Santos E., Yarto Ramírez M., Gavilán-García I., Castro-Díaz J., Gavilán-García A., Rosiles R., López-Villegas T. 2006. **Analysis of Arsenic, Lead and Mercury in Farming Areas with Mining Contaminated Soils at Zacatecas, Mexico**. *Journal of the Mexican Chemical Society*. **50(2)**, 57-63.

Sastre J., Sahuquillo A., Vidal M., Rauret G. 2002. **Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in environmental samples: microwave-assisted total digestion versus aqua regia and nitric acid extraction**. *Analytica Chimica Acta*. **462**, 59-72.

Schmoger M.E., Oven M., Grill E. 2000. **Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants**. *Plant Physiology*. **122**, 793-801.

Seaward M.R.D., Richardson D.H.S. 1990. **Atmospheric sources of metal pollution and effects on vegetation.** In: Shaw A.J. (Ed.). Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects. CRC. Press, Florida, pp. 75-92.

Seregin I.V., Kozhevnikova A.D. 2006. **Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants.** Russian Journal of Plant Physiology. **53**, 257-277.

Shannon M.A., Bonh P.W., Elimelech M., Georgiadis J.G., Mariñas B.J., Mayes A.M. 2008. **Science and technology for water purification in the coming decades.** Nature. **452**, 301-310.

Sharma S.S., Dietz K.J. 2006. **The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress.** Journal of Experimental Botany. **57**, 711-726.

Sharma N.C., Gardea-Torresdey J.L., Parsons J., Sahi S.V. 2004. **Chemical speciation and cellular deposition of lead in *Sesbania drummondii*.** Environmental Toxicology and Chemistry. **23**, 2068-2073.

Shen W.H., Petit Annik., Guern J., Tempé J. 1988. **Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots.** Proceedings of the National Academy of Sciences USA. **85**, 3417-3421.

Shen W.H., Davioud E., David C., Barbier-Brygoo H., Tempé J., Guern J. 1990. **High sensitivity to auxin is a common feature of hairy root.** Plant Physiology. **94**, 554-560.

Sheoran V., Sheoran A.S., Poonia P. 2009. **Phytomining: A review.** Minerals Engineering. **22**, 1007-1019.

Singh O.V., Labana S., Pandey G., Budhiraja R., Jain R.K. 2003. **Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil.** Applied Microbiology and Biotechnology. **61**, 405-412.

Sinkar V.P., White F.F., Gordon P.M. 1987. **Molecular biology of Ri-plasmid – A review.** Journal of Biosciences. **11**, 47-57.

Slightom J.L., Durand-Tardif M., Jouanin L., Tepfer D. 1986. **Nucleotide sequence analysis of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid: identification of open reading frames.** The Journal of Biological Chemistry. **261**, 108-121.

Soylak M., Tuzen M., Souza A.S., Korn MG. A., Ferreira S.L.C. 2007. **Optimization of microwave assisted digestion procedure for the determination of zinc, copper and nickel in tea samples employing flame atomic absorption spectrometry.** Journal of Hazardous Materials. **149**, 264-268.

Spellman F.R. 2009. **The Science of Environmental Pollution.** 2a Ed. Boca Raton. CRC Press. 592 pp.

Srivastava N.K., Majumder C.B. 2008. **Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater.** Journal of Hazardous Materials. 151, 1-8.

- Stepansky A., Leustek T. 2006. **Histidine biosynthesis in plants**. *Amino Acids*. **30**, 127-142.
- Sun Y., Zhou Q., Y Diao Ch. 2008. **Effects of cadmium and arsenic on growth and metal accumulation of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L.** *Bioresource Technology*. **99**, 1103-1110.
- Talke I.N., Hanikenne M., Krämer U. 2006. **Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*.** *Plant Physiology*. **142**, 148-167.
- Tanhan P., Kruatrachue M., Pokethitiyook P., Chaiyarat R. 2007. **Uptake and accumulation of cadmium, lead and zinc by Siam weed [*Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson]**. *Chemosphere*. **68**, 323-329.
- Taylor V.F., Toms A., Longerich H.P. 2002. **Acid digestion of geological and environmental samples using open-vessel focused microwave digestion.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **372**, 360-365.
- Tennstedt P., Peisker D., Bottcher C., Trampczynska A., Clemens S. 2009. **Phytochelatin synthesis is essential for the detoxification of excess zinc and contributes significantly to the accumulation of zinc.** *Plant Physiology*. **149**, 938-948.
- Tepfer D., Metzger L., Prost R. 1989. **Use of roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* in rhizosphere research: applications in studies of cadmium assimilation from sewage sludges.** *Plant Molecular Biology*. **13**, 295-302.
- Teuschler L., Klaunig J., Camey E., Chambers J., Conolly R., Gennings C., Giesy J., Hertzberg R., Klaassen C., Kodell R., Paustenbach D., Yang R. 2002. **Support of science-based decisions concerning the evaluation of the toxicology of mixtures: A new beginning.** *Regulatory Toxicology Pharmacology*. **36**, 34–39.
- Veena V., Taylor C.G. 2007. ***Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications.** *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. **43**, 383-403.
- Vinterhalter B., Savić J., Platiša J., Raspor M., Ninković S., Mitić N., Vinterhalter D. 2008. **Nickel tolerance and hyperaccumulation in shoot cultures regenerated from hairy root cultures of *Alyssum murale* Waldst et Kit.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **94**, 299-303.
- Walker D.J., Bernal M.P. 2004. **The effects of copper and lead on growth and zinc accumulation of *Thlaspi caerulescens* J. and C. Presl: Implications for phytoremediation of contaminated soils.** *Water, Air and Soil Pollution*. **151**, 361-372.
- Weber M., Harada E., Vess C., Roepenack-Lahaye E., Clemens S. 2004. **Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotiamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors.** *The Plant Journal*. **37**, 269-281.

- Walas S., Wójtowicz M., Mrowiec H., Zegar W. 2004. **Comparison of wet microwave digestion methods of plant materials for the determination of metals by flame atomic absorption spectrometry.** International Journal of Environmental Analytical Chemistry. **84**, 1023–1032.
- Waldron K.J., Robinson N.J. 2009. **How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal?.** Nature Reviews Microbiology. **7**, 25-35.
- White F.F., Taylor B.H., Huffmann G.A., Gordon M.P., Nester E.W. 1985. **Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*.** Journal of Bacteriology. **164**, 33-44.
- Wilde E.W., Benemann J.R. 1993. **Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae.** Biotechnology Advances. **11**, 781-812.
- Williams L.E., Pittman J.K., Hall J.L. 2000. **Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants.** Biochimica et Biophysica Acta. **1465**, 104-126.
- Willems G., Drager D.B., Courbot M., Gode C., Verbruggen N., Saumitou-Laprade P. 2007. **The genetic basis of zinc tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp *halleri* (Brassicaceae): an analysis of quantitative trait loci.** Genetics. **176**, 659-674.
- Wintz H., Fox T., Wu YY, Feng V., Chen W., Chang HS., Zhu T., Vulpe C. 2003. **Expression Profiles of *Arabidopsis thaliana* in Mineral Deficiencies Reveal Novel Transporters Involved in Metal Homeostasis.** The Journal of Biological Chemistry. **278**, 47644-47653.
- Wong C.K.E., Cobbett C.S. 2009. **HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*.** New Phytologist. **181**, 71-78.
- Wu G., Kang H., Zhang X., Shao H., Chu L., Ruan C. 2010. **A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soil: Issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities.** Journal of Hazardous Materials. **174**, 1-8.
- Wycisk K., Kim E.J., Schroeder J.I., Krämer U. 2004. **Enhancing the first enzymatic step in the histidine biosynthesis pathway increases the free histidine pool and nickel tolerance in *Arabidopsis thaliana*.** FEBS Letters. **578**, 128-134.
- Xue S.G., Chen Y.X., Reeves R.D., Baker A.J.M., Lin Q., Fernando Q.R. 2004. **Manganese uptake and accumulation by the hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae).** Environmental Pollution. **131**, 393-399.
- Yaman M, Bakirdere S. 2003. **Identification of Chemical Forms of Lead, Cadmium and Nickel in Sewage Sludge of Waste Water Treatment Facilities.** Microchimica Acta. **141**, 47–54.
- Yan C., Li G., Xue P., Wei Q., Li Q. 2010. **Competitive effect of Cu (II) and Zn (II) on the biosorption of lead (II) by *Myriophyllum spicatum*.** Journal of Hazardous Materials. **179**, 721-728.