UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Uso potencial de cultivos de raíces pilosas de especies vegetales hiperacumuladoras de metales para fines de fitorremediación de aguas contaminadas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

RAQUEL SÁNCHEZ IZQUIERDO

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dr. JOSEPH DUBROVSKY

COMITÉ TUTOR: Dra. Claudia Ponce de León Hill
Dra. Guadalupe Zavala Padilla

MÉXICO, D.F. **FEBRERO, 2012**

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Uso potencial de cultivos de raíces pilosas de especies vegetales hiperacumuladoras de metales para fines de fitorremediación de aguas contaminadas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

RAQUEL SÁNCHEZ IZQUIERDO

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dr. JOSEPH DUBROVSKY

COMITÉ TUTOR: Dra. Claudia Ponce de León Hill
Dra. Guadalupe Zavala Padilla

MÉXICO, D.F. **FEBRERO, 2012**

VNIVERSIDAD NACIONAL AVTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/203/12

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **31 de octubre de 2011** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **SÁNCHEZ IZQUIERDO RAQUEL** con número de cuenta **300301966** con la tesis titulada **"Uso potencial de cultivos de raíces pilosas de especies vegetales hiperacumuladoras de metales para fines de fitorremediación de aguas contaminadas"**, realizada bajo la dirección del (la**) DR. JOSEPH DUBROVSKY JANCOVSKY:**

Presidente:	DRA. CHRISTINA DESIREE SIEBE GRABACH
Vocal:	DRA. SILKE CRAM HEYDRICH
Secretario:	DRA. CLAUDIA ALEJANDRA PONCE DE LEÓN HILL
Suplente:	M. EN C. MARÍA DEL PILAR FERNÁNDEZ LOMELÍN
Suplente:	DRA. GEORGINA PONCE ROMERO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de abril de 2012

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MCAA/MJFM/ASR/ipp

Agradecimientos

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Agradezco a CONACYT, por la beca otorgada numero 225410 durante el 2009-2011, que me permitió concluir la Maestría.

También agradezco de manera muy especial a los miembros del Comité Tutor a la Dra. Claudia Ponce de León Hill y a la Dra. Guadalupe Zavala Padilla por su tiempo, apoyo y por sus valiosos comentarios que permitieron eriquecer el trabajo realizado.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Joseph Dubrovsky por el apoyo otorgado durante todos estos años.

Agradezco con mucho cariño a Ramces porque sin el esta tesis no hubiese sido terminada, por todos sus consejos y apoyo.

A Selene quien siempre estuvo dispuesta a ayudarme en el laboratorio y me brindo su compresinsión y cariño para falicitarme el camino a este momento.

A la Dra. Claudia Ponce de León y a la Unidad de Análisis Ambiental por las facilidades para la obteción de resultados.

También agradezco de manera especial al M en C. Manuel Hernández Quiroz quien se tomo el tiempo y me brindo su apoyo y conociemiento, además de ser un gran amigo.

A mis amigos, Jazmín, Yamel, Héctor, Gerardo y Ángel por todos los buenos momentos, por hacer de la Mestría una gran experiencia de vida, brindarme su apoyo, escucharme y aconsejarme.

A los duendes mágicos Horacio y David, por su apoyo y muchos momentos de alegría dentro y fuera del laboratorio.

A Paloma, Dalila, Nalleli, Luisa y Fernando, quienes a pesar del tiempo y la distancia siempre están conmigo alentándome para que nunca me de por vencida.

De manera muy especial quiero dar las gracias a mi familia:

A mis abuelos Alicia y Porfirio y a mi tía Mari, que hacen de mis días con ellos los más felices.

Agradezco a mi hermana Alicia, por su compañía y cariño y su buen ejemplo como una gran mujer de ciencia.

A mis padres que a pesar de las crisis siempre me apoyaron, me aconsejaron y me brindaron su cariño y comprensión.

Por que ésta no es mi tesis sino NUESTRA tesis, mil gracias.

Dedicatoria

A mí a abuelo Porfirio, un hombre incansable,

trabajador y de gran corazón.

ÍNDICE

RESUMEN 3
ABSTRACT 4
1. INTRODUCCIÓN 5
2. ANTECEDENTES 7
2.1 Contaminación del agua en México 7
2.2 Sistemas alternativos de remoción de contaminantes 8
2.2.1 Biorremediación 8
2.2.2 Bioadsorción 9
2.3 Especies vegetales hiperacumuladoras de metales 12
2.4 Fitorremediación 14
2.5 Metales pesados, sus efectos en la salud y los ecosistemas 15
2.6 Principales usos del zinc y su potencial efecto tóxico 16
2.7 Principales usos del cadmio y su potencial efecto tóxico 17
2.8 Principales usos del níquel y su potencial efecto tóxico 18
2.9 Mecanismos de tolerancia a metales y su bioacumulación en plantas 19
2.10 *Arabidopsis halleri* 20
2.11 *Alyssum lesbiacum* 21
2.12 Inducción de raíces pilosas por *Agrobacteruium rhizogenes* 22
2.13 Raíces pilosas como modelo de estudio de la tolerancia a metales y su bioacumulación en plantas 23
3. HIPÓTESIS 25
4. OBJETIVO GENERAL 25
5. OBJETIVOS PARTICULARES 25
6. METODOLOGÍA 26
6.1 Diseño esperimental 26
6.2 Material biológico 28
6.3 Condiciones de crecimiento 28
6.4 Inducción de raíces pilosas 28
6.5 Confirmación del genotipo transformado 29
6.6 Cultivo de raíces pilosas 30
6.7 Exposición de las raíces pilosas de *A. lesbiacum* a níquel 30
6.7.1 Ensayo de bioacumulación 30

6.7.2 Ensayo de bioadsorción 31
6.8 Comparación de la supervivencia del meristemo apical de la raíz 32
6.9 Digestión del material vegetal en horno de microondas 32
6.9 Determinación de la concentración total de metales 33
6. 11 Controles de calidad 33
6.12 Análisis estadístico 33
7.1 Protocolo de inducción de raíces pilosas 34
7.2 Confirmación del evento de transformación 35
7.3 Cultivos de raíces pilosas 36
7.4 Comparación del porcentaje de supervivencia del meristemo apical 37
7.5 Variaciones en el pH de la solución 39
7.6 Acumulación de níquel en las raíces pilosas de *A. montanum* y *A. lesbiacum* 41
7.7 Bioadsorción de níquel en las raíces pilosas de *A. montanum* y *A. lesbiacum* 44
7.8 Comparación de acumulación de Ni en los bioensayos de bioacumulación (raíces vivas) y bioadsorción (raíces muertas) 45
8. DISCUSIÓN 46
8.1 Inducción y establecimiento de cultivos de raíces pilosas de *A. halleri* y *A. thaliana* 46
8.2 Efecto del Ni en las raíces pilosas de *A. lesbiacum* y *A. montanum* 47
8.3 Biocumulación de Ni en las raíces de *A. lesbiacum* y *A. montanum* 49
8.4 Bioadsorción de Ni de las raíces pilosas de *A. lesbiacum* y *A. montanum* 52
9. CONCLUSIONES 54
10. APÉNDICE 55
11. REFERENCIAS 56

RESUMEN

La contaminación del agua con metales ha aumentado recientemente, existen tecnologías para eliminar estos contaminantes de los efluentes contaminados, como la fitorremediación, o biosorción y aunque hay muchas plantas hiperacumuladoras de metales utilizados para este fin, estas especies tienen poca biomasa. En este trabajo se propone el uso de raíces pilosas de especies hiperacumuladoras para incrementar su biomasa. Se comparó el potencial de acumulación de las raíces vivas y muertas de éstas especies con el objetivo de investigar su posible aplicación en procesos de fitorremediación.

Se indujeron cultivos de raíces pilosas en la especie hiperacumuladora de cadmio y de zinc *Arabidopsis halleri*, pero fue muy difícil propagar los cultivos en medio de cultivo líquido. Así que, se decidió seguir trabajando con los cultivos de raíces pilosas *Alyssum lesbiacum,* hiperacumuladora de níquel y de la especie no acumulador de *Alyssum montanum* como el control. Encontramos que las raíces pilosas vivas de *A. lesbiacum* toleraron concentraciones altas de Ni y acumularon un máximo de 3 890 $mgkg^{-1}$. Inesperadamente, las raíces pilosas de *A. montanum* acumularon aún más Ni que la especie hiperacumuladora, pero son sensibles a concentraciones altas de Ni y su capacidad de acumulación disminuye con el tiempo de exposición. En contraste, las raíces pilosas muertas de *A. lesbiacum* adsorbieron 2,6 veces en comparación con las raíces vivas y presentaron una adsorción máxima de Ni de 10 240 mg kg^{-1}. Las raíces pilosas *de A. montanum* también adsorbido más de Ni (9 820 $mgkg^{-1}$) con respecto a las raíces vivas.

Estos datos sugieren que las raíces pilosas vivas de *A. lesbiacum* son capaces de tolerar y acumular grandes cantidades de Ni independientemente de la parte aérea, sin embargo, su capacidad de acumulación de Ni disminuyó posiblemente debido a las condiciones de cultivo. Por lo que en este trabajo se demuestra que la biomasa muerta de *A. lesbiacum* o incluso la biomasa de *A. montanum* puede adsorber gran cantidad de Ni en la pared celular y por lo tanto puede ser utilizado como un filtro biológico para la eliminación de Ni efluente contaminado.

ABSTRACT

The water pollution with metals has increased recently; to remove those metals from water, there are technologies like the phytoremediation or biosorption. There are many hyperaccumulators plants of metals used for this aim, but these species has little biomass, for that reason we suggested induce hairy roots to obtain more biomass of these species. In this work we compare the accumulation potential of the live and dead hairy root of this hyperaccumulator species with the objective to investigate its possible phytoremediation application.

We induced hairy roots cultures of the cadmium and zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri,* but were the hairy roots very difficult to propagate in liquid nutrient medium. So we decide to worked with hairy root cultures of the nickel hyperaccumulator *Alyssum lesbiacum* and no accumulator *Alyssum montanum* as control previously established in the lab. We found that the live hairy roots of *A. lesbiacum* tolerate high Ni concentrations and they accumulated a maximum of 3,890 mg/kg. Unexpectedly hairy roots of *A. montanum* can accumulate even more Ni than the hyperaccumulator species but are sensitive to high concentration and its storage capacity decreases with exposure time. In contrast the dead hairy roots of *A. lesbiacum* adsorbed 2.6 fold compared with the live roots with a maximum Ni adsorption of 10,240 mg/kg. The dry biomass of *A. montanum* also adsorbed more Ni (9 820 mg/kg) with respect to the living roots.

These data suggest that the live hairy roots of *A. lesbiacum* were able to tolerate and to accumulate large amounts of Ni independently of the aerial part; however, its Ni accumulation capacity depends on the culture conditions. In this work we show that the dead biomass of *A. lesbiacum* or even the biomass of *A. montanum* can uptake great concentration of Ni in the cell wall therefore and they can be used as a biological filter for removal of Ni contaminated effluent.

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación de los ecosistemas es uno de los problemas más graves que afrontan todos los países del mundo, resultado de un desarrollo industrial acelerado.

Los metales pesados son un grupo de contaminantes muy abundantes que potencialmente son perjudiciales para los seres vivos, por ejemplo el cadmio, el cobre, el plomo o el níquel. Algunos de ellos como el zinc, el cobre, el cobalto o el níquel son micronutrientes esenciales para los organismos, sin embargo, en concentraciones altas pueden llegar a ser tóxicos, por ejemplo, en humanos pueden causar dermatitis y cáncer. Los metales más peligrosos en la lista de contaminantes prioritarios de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos, son el plomo, mercurio, cromo, cobre, cadmio, zinc y níquel (EPA, 2005). Debido al impacto negativo que estos metales tienen sobre el medio ambiente es necesario removerlos de los ecosistemas contaminados así como evitar que sigan siendo liberados, principalmente a los cuerpos de agua donde están biodisponibles y pueden dispersarse de manera rápida.

Para afrontar el problema existen numerosas tecnologías basadas en métodos fisicoquímicos pero que pueden llegar a ser muy costosas (Nuñez *et al*., 2004 y Pilon-Smits, 2005). Se han buscado nuevas estrategias, tales como la biorremediación y la bioadsorción, las cuales presentan muchas ventajas que las hacen soluciones prometedoras. Dentro de la biorremediación se pueden encontrar varias alternativas como la fitorremediación, tecnología que hace uso de las plantas para degradar, inmovilizar o secuestrar en sus tejidos los contaminantes (Perr *et al.,* 2006; Nuñez *et al.,* 2004). Por otro lado está también la bioadsorción, que se basa principalmente en el uso de biomasa muerta de varios tipos de organismos, con el fin de remover contaminantes de cuerpos de agua contaminados (Ahluwalia y Goyal, 2007). Ambas tecnologías tienen el fin de disminuir e incluso eliminar los agentes contaminantes de los ecosistemas, aunque se sabe aún poco del comportamiento de esos procesos bajo condiciones experimentales específicas.

Existen algunas especies vegetalescapaces de acumular grandes cantidades de uno o varios metales en sus tejido, conocidas como plantas hiperacumuladoras Dentro de este grupo podemos encontrar a especies como *Alyssum lesbiacum* reportada como especie hiperacumuladora de níquel (≥ 1% peso seco) (Brooks*et al*., 1979) y *A. halleri* capaz de acumular cadmio y zinc en sus tejidos de manera extraordinaria (≥ 1% y 0.1 % de la materia seca, respectivamente) (Bert *et al*., 2000*;* Bert *et al*., 2002; Bert *et al*. 2003).

Bajo este contexto, este trabajo trata de contribuir al entendimiento de la capacidad que poseen algunas plantas para acumular y adsorber en sus tejidos concentraciones altas de metales, con el fin de usarlas como posibles filtros biológicos para recuperar sistemas acuáticos contaminados con metales pesados.

Aunque el uso de plantas hiperacumuladoras es prometedor, su eficiencia depende no sólo de la capacidad de las plantas para acumular o adsorber metales, sino también de la cantidad de biomasa, lya que entre mayor biomasa mayor superficie de bioadsorción o bioabsorción, por lo que en muchos casos puede ser una limitante. Por el presente trabajo propone aumentar la biomasa de ambas especies hiperacumuladoras mediante la inducción de raíces pilosas.

Las raíces pilosas son consecuencia de la infección de *Agrobacterium rhizogenes* a plantas que han sufrido algún daño (Pletsch *et al*. 1999, Tzfira y Citovsky, 2002). Las raíces pilosas se caracterizan por la formación masiva de raíces con un gran número de pelos radicales (Shanks y Morgan, 1999; Nilsson *et al*., 1997). También se ha probado que las raíces pilosas de especies hiperacumuladoras de metales son capaces de acumular el contaminante independientemente de la parte aérea (Tepfer et al. 1989; Nedelkoska y Doran 2000; Sánchez, I., 2008). Esta cualidad resulta de suma importancia, pues nos permite propagar las raíces pilosas para usarlas como filtros biológicos independientemente de la zona que va a ser remediada , del clima que prevalezca en ésta y sobre todo sin peligro a provocar un desequilibrio ecológico por la introducción de especies no originarias del lugar a ser tratado.

2. ANTECEDENTES

2.1 Contaminación del agua en México

En México, existen graves problemas de contaminación por compuestos orgánicos e inorgánicos. La SEMARNAT (2010) a través del Registro de Emisiones y Transferencias de Contaminantes (RETC) reportó para el año 2008 la emisión de más de 196 millones de toneladas de 78 sustancias contaminantes, la mayoría de éstas emitidas al aire.

Los contaminantes, por grupo de sustancias que más se emitieron fueron los hidrocarburos con poco más de 541 toneladas, seguidos por los metales con casi 400 toneladas, la mayoría de éstos contaminantes pueden llegar al agua; el problema se incrementa de manera abrumadora con el desarrollo industrial y minero. En 2008 el 16% de las aguas superficiales estaban contaminadas, el 48% poco contaminadas, el 21 % era aceptable y sólo el 6% era de calidad excelente (CNA; 2010). Del total de agua contaminada (descargas urbanas e industriales) sólo el 36% recibe algún tipo de tratamiento. A la mayor parte de esta agua se le da un tratamiento secundario mediante lodos activados y lagunas de estabilización, procesos que tienen entre 80 y 90% de eficiencia para la remoción de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO).

Sin embargo, en 2008 el país sólo contaba con 1833 plantas de tratamiento de aguas residuales municipales, las cuales trataron 83.6 m^3/s equivalentes al 40% de los 208 m^3/s recolectados por el sistema de alcantarillado. Por otro lado la industria generó 190.4 m^3/s de agua contaminada y trató sólo el 33.8%. Por lo tanto, la mayoría del líquido que se vierte a ríos, a lagos o a mares llega sin ningún tratamiento previo. El volumen de aguas residuales que anualmente regresan a las corrientes con contaminantes es de 20 km^3. La industria genera el 31% de estas aguas residuales que contienen entre otras cosas metales pesados, ácidos, grasas y aceites (CNA, 2010).

Ejemplo de la poca eficiencia en el tratamiento de las aguas residuales es la Ciudad de México, ya que ahí se decidió iniciar el tratamiento de las aguas residuales tratadas apenas en el año de 1956. Actualmente existen 27 plantas de tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, sólo el 7% de las aguas residuales totales de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, llegan a las plantas de tratamiento. En el Distrito Federal, el 83% de las aguas de re-uso se destinan a la irrigación de áreas verdes y a actividades recreativas, el 10% se utiliza en las industrias, el 5% para el riego agrícola y el 2% para usos comerciales lavado de autos, etc. (COPO, 2004).

Dada la magnitud del problema se han buscado algunas alternativas para lograr la remoción de contaminantes de aguas residuales, y así evitar daños a la salud humana. Algunas de estas alternativas son las tecnologías basadas en métodos fisicoquímicos, como la precipitación, la hidrólisis o las reacciones de oxidoreducción para la remoción de contaminantes de aguas residuales. Sin embargo, estas estrategias llegan a ser muy costosas o insuficientes (Núñez *et al*., 2004 y Pilon-Smith, 2005).

2.2 Sistemas alternativos de remoción de contaminantes

Con base en la información anterior se entiende la necesidad de implementar una tecnología que permita recuperar los sitios contaminados de manera eficiente. Como ya se mencionó el uso de material biológico con este propósito, parece ser la mejor opción por el momento.

2.2.1 Biorremediación

La biorremediación es una serie de procesos que consisten en el uso de organismos vivos (bacterias, algas, hongos, plantas o asociaciones simbióticas de plantas y hongos como las micorrizas) para remover, degradar o transformar sustancias orgánicas o inorgánicas de un sistema contaminado (suelo/sedimento o agua) (Demian, 1999; Volke y Velasco, 2002). Los microorganismos (bacterias, algas y hongos) generalmente se benefician al catalizar reacciones químicas que les permiten transformar su fuente de energía, es decir, usan a los contaminantes como fuente de energía que luego transforman en energía química (ATP) (Demian 1999; Sims *et al.,* 1993).

Con esta tecnología es posible remover residuos tóxicos de forma natural y eficiente. Es importante mencionar que el método que se utilice debe ser optimizado con el fin de reducir o incluso eliminar el contaminante en un corto tiempo y a bajo costo. Se pueden usar organismos propios del sitio o ajenos a éste, de manera *in situ* o *ex situ*; estas condiciones dependen del proceso que se elija.

Existen varios procesos de biorremediación (Velasco y Volke, 2002), entre los más comunes se encuentran:

- Bioestimulación: en este proceso se adiciona oxígeno, nutrientes o ambos al suelo contaminado, para estimular la actividad de microorganismos capaces de degradar los contaminantes.
- Biolabranza: el suelo contaminado se mezcla con nutrientes y suelo limpio y se remueve constantemente para favorecer la aireación.

- Bioaumentación: En este proceso se adicionan microorganismos vivos capaces de degradar contaminantes.
- Biorreactores: esta tecnología está totalmente controlada y permite hacer uso de procesos químicos, físicos y biológicos, que mejoran y aceleran la biodegradación.
- **Fitorremediación:** En este caso se usan especies vegetales capaces de remover, transferir, estabilizar concentrar o destruir contaminantes orgánicos o inorgánicos. Ofrece ventajas adicionales, como la posibilidad de recuperar contaminantes como los metales pesados.

Comúnmente se entiende que los procesos de biorremediación son llevados a cabo por organismos vivos con el objetivo de disminuir o incluso degradar los contaminantes de algún ecosistema, sin embargo, también existe un proceso que busca el mismo fin pero donde se utiliza biomasa muerta de diversa clase de organismos y se conoce como bioadsorción.

2.2.2 Bioadsorción

La adsorción se define como el proceso por el cual las moléculas que se encuentran en solución (sorbatos) se adhieren a una superficie sólida (sorbente) debido a la alta afinidad del sorbente por el sorbato; éste es atraído y "unido" a la superficie a través de diferentes mecanismos. Así que basados en este principio fisicoquímico, se propuso una tecnología prometedora para el tratamiento de aguas contaminadas con metales basada en el uso de resinas sintéticas de intercambio iónico que generalmente están comprimidas en columnas de flujo a alta presión; sin embargo, aunque eficientes, las resinas pueden llegar a ser muy costosas. Volesky en 2001 estimó que su costo es aproximado a los 2 mil millones de dólares al año en los Estados Unidos. Dado lo poco rentable que resulta ésta tecnología se ha buscado la manera de sustituir a las resinas sintéticas por materiales menos costosos y se encontró que diferentes tipos de material biológico podrían servir con este propósito; entonces se nombró a esta tecnología boadsorción (**Figura 1**). Ésta utiliza básicamente el mismo principio del intercambio iónico con la diferencia de que el precio del material biológico está entre 3 y 5 dólares por kilo, es decir 10 veces menos que el de las resinas (Volesky, 2001; http://biosorption.mcgill.ca/BT/BTbrief.htm). Esta tecnología consiste en un proceso pasivo de adsorción de los metales gracias a la composición y estructura de la pared celular de una gran variedad de organismos, por lo que es posible usar la biomasa muerta de éstos, a los que se les conocen como bioadsorbentes (Volesky, B. 2001).

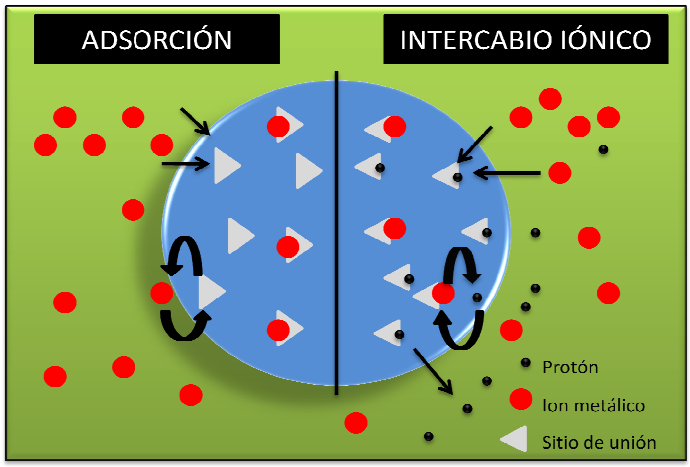


Figura. 1. Dos mecanismos que participan en el proceso de bioadsorción. Durante la adsorción el sorbato presenta cierta afinidad por el sorbente y se une a la superficie. Esquema modificado de (Volesky, 2004).

Es posible utilizar diferentes organismos como agentes adsorbentes, por ejemplo, algunas especies de algas, de hongos, de bacterias o plantas (Vieira y Volesky 2000; Wang y Chen, 2009). Existen muchos trabajos que buscan mejores bioadsorbentes y se han enfocado sobre todo en encontrar bioadsorbentes más baratos o cuya abundancia sea muy significativa con el fin de reducir costos, pero no hay muchos trabajos en los que se busquen aquellos que puedan tener una gran capacidad de adsorción (Volesky, 2001).

La capacidad de adsorción del bioadsorbente depende tanto de los componentes de la superficie celular así como de la estructura de la pared celular. Grupos funcionales que contienen N, O, P ó S participan directamente en la unión de metales (Wang y Chen, 2009), donde se pueden dar procesos como el intercambio iónico, la complejación, la coordinación y quelación o por adsorción física y microprecipitación. La capacidad de adsorción varía con el tipo de biomasa así como de las condiciones fisicoquímicas del efluente y del metal que se pretende recuperar. Algunos aspectos fisicoquímicos que determinan la capacidad de bioadsorción son: 1) el pH de la solución, 2) la temperatura, 3) la cantidad de biomasa, 4) la fuerza iónica, 5) la concentración inicial del metal y 6) la tasa de agitación y el periodo de exposición (Das, 2010).

La mayor parte de los trabajos realizados con el fin de entender mejor este proceso se han enfocado a evaluar la capacidad de bioadsorción (mg metal / g peso seco de bioadsorbente) de bacterias, hongos y algas bajo diferentes condiciones. Algunos trabajos analizan el efecto de tratamientos (químicos o físicos) del bioadsorbente previos a la exposición al contaminante con el fin de incrementar los sitios de

unión al metal o experimentos cuyo objetivo es evaluar la interacción del bioadsorbente con uno o varios metales. También existen numerosas investigaciones dedicadas a determinar la importancia de parámetros físicos y químicos en el proceso de bioadsorción, por ejemplo variaciones en el pH de la solución. Sin embargo, son pocos los trabajos que se han realizado con plantas y la mayoría se han enfocado a evaluar la capacidad de biomasa de desecho provenientes de procesos industriales como la fabricación de jugos (Senthilkumaar *et al*., 2000; Vaughan *et al*., 2001).

Uno de los aspectos más importantes a considerar dentro de todo el proceso de bioadsorción es la inmovilización. Dado que los bioadsorbentes son secados y molidos en partículas muy pequeñas (para incrementa la superficie de adsorción) deben ser inmovilizados en matrices de soporte, para que puedan resistir las condiciones de presión dentro de los bioreactores por donde se hace fluir el agua a tratar. Las matrices más utilizadas hasta ahora están construidas a partir de alginato de calcio o de sodio, poliacrilamida, poliuretano, polisulfonato y silica gel; estas matrices poliméricas determinan la fuerza mecánica y la resistencia química final del bioadsorbente (Wang y Chen, 2009).

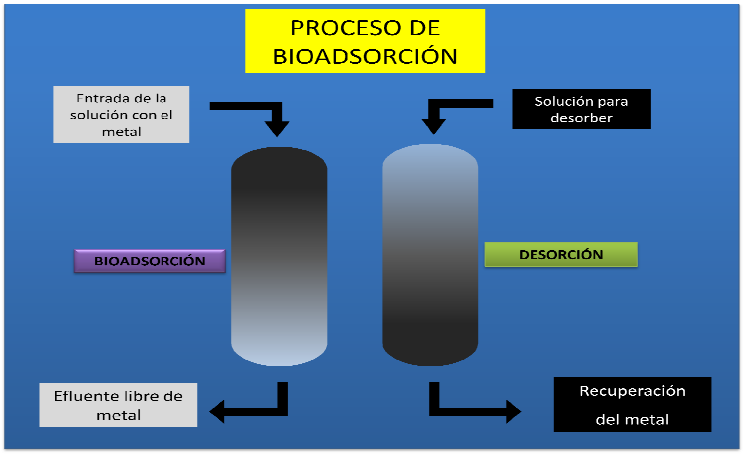


Figura. 2. Proceso de bioadsorción, que incluye la adsorción de los iones metálicos del efluente contaminado y su posterior desorción para su recuperación. Figura modificada de http://www.bvsorbex.net/sxProcess.htm

Por otro lado, el uso de modelos matemáticos ayudan a comprender mejor los mecanismos de bioadsorción con el fin de eficientar el proceso. Permiten no sólo representar sino además ayudan a explicar y predecir el comportamiento experimental, brindando información de la capacidad de captación de metal de un bioadsorbente. Entre los modelos más comúnmente usados están el modelo de Langmuir que está basado en varios supuestos: 1) supone que las fuerzas que se ejercen en la superficie de átomos químicamente no saturados (número total de sitios de unión) no se extienden más allá del diámetro de una molécula adsorbida y por lo tanto se limita a una monocapa; 2) todos los sitios de la

superficie son iguales y sólo una molécula de sorbato puede reaccionar con un sitio activo; 3) la capacidad de una molécula de ser adsorbida en un lugar determinado es independiente de la ocupación de los sitios vecinos y 4) en la presencia de un solo sorbato. Además considera que la tasa de adsorción y desorción de la superficie es igual. Por otro lado, el modelo de Freundlich se basa en que los sorbentes están constituidos por superficies heterogéneas. Es importante mencionar que ninguno de estos modelos incorpora variables externas como los factores ambientales (Volesky, 2004; Febrianto *et al*., 2009; Wang, *et al*., 2009).

La bioadsorción resulta ser una estrategia muy atractiva, ya que el uso de biomasa muerta presenta varias ventajas: 1) no se requieren nutrientes para mantener vivos a los organismos, 2) puede ser expuesta a ambientes extremos, 3) el proceso es independiente del metabolismo celular, 4) no es necesario conservar ,condiciones de asepsia, 5) es posible manejar un amplio intervalo de condiciones de operación como pH o temperatura y 6) es posible desadsorber y recuperar el metal fácilmente y la biomasa puede ser incinerada eliminando tratamientos posteriores y pueden ser bioadsorbentes con capacidad de acumular varios metales o pueden ser específicos para un metal (Ahluwalia y Goyal, 2007). Esta herramienta ha sido tan exitosa que existen ya varias patentes, por ejemplo AlgaSORB que usa a *Chorella vulgaris* o AMT-BIOCLAIM usa una especie del género *Bacillus* (Wang y Chen, 2009).

2.3 Especies vegetales hiperacumuladoras de metales

Una de las cualidades más extraordinarias de las plantas es su capacidad de adaptarse y colonizar todo tipo de ecosistemas, desde los desiertos más hostiles hasta las montañas más altas y frías del planeta. Por lo tanto, no es de sorprender que existan algunas especies que pueden crecer en suelos que naturalmente tienen concentraciones altas de metales (suelos serpentínicos). Estas especies poseen diversas estrategias que les permiten sobrevivir en concentraciones altas de metales pesados (**Figura. 3**). Una de esas estrategias es la exclusión que consiste en evitar la absorción o la translocación de los metales a la parte aérea. Otras especies tienen estructuras especializadas o mecanismos moleculares que les permiten acumular metales en sus tejidos en concentraciones no tóxicas, entonces se habla de una estrategia acumuladora. También hay plantas conocidas como indicadoras que acumulan en sus tejidos concentraciones de metales similares a las que se encuentran en el suelo donde crecen. Incluso, hay especies capaces de acumular metales en sus tejidos en elevadas concentraciones sin presentar efectos de toxicidad, por lo que son llamadas plantas hiperacumuladoras (Kidd *et al*., 2007).

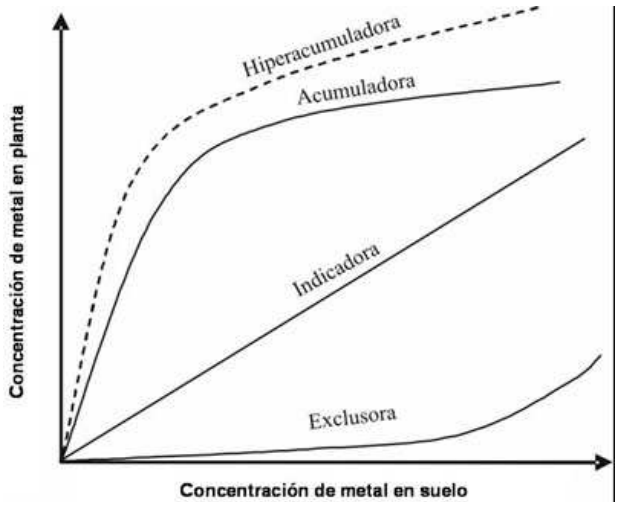


Figura 3. Respuestas típicas de las plantas frente a la presencia de metales pesados en el suelo (Adriano, 2001).

Una planta es considerada hiperacumuladora de metales, si creciendo en su hábitat natural tiene una elevada concentración de metales en sus tejidos aéreos (Reevs y Baker, 2000). La concentración que puede acumular varía dependiendo del metal. En la Tabla 1 se enlistan algunas de las 400 especies vegetales hiperacumuladoras que se conocen, así como la concentración mínima del metal que deben acumular para ser consideradas hiperacumuladoras.

Tabla. 1. Especies vegetales hiperacumuladoras de metales, los metales que acumulan y la cantidad mínima de metal en sus tejidos aéreos para ser consideradas especie hiperacumuladora (Prassad y Freitas, 2003; Barceló y Poschenrieder, 2003).

Especie	Metal que acumula	Cantidad mínima que define a la planta como hiperacumuladora, µg/g (Peso seco)
Thlaspi goesingense	Níquel	≥1000
Thlaspi rotundifolium	Plomo	≥1000
Thlaspi caerulescens	Níquel, zinc	≥1000; 10,000
Berkheya codii	Níquel	≥1000
Alyssum pterocarpum	Níquel, zinc y magnesio	≥1000; 10,000
Alyssum bertholini	Níquel	≥1000
Arabidopsis halleri	Cadmio y zinc	≥100; 10,000

2.4 Fitorremediación

Ya que los métodos convencionales usados para recuperar ecosistemas contaminados resultan ser muy costosos y en algunos casos insuficientes, se ha recurrido a la fitorremediación, que se basa en la capacidad de algunas plantas para remover, reducir, degradar, mineralizar, estabilizar o inmovilizar agentes contaminantes orgánicos e inorgánicos del suelo, de sedimentos o de sistemas acuáticos. Dentro de esta tecnología hay varios procesos (**Figura 4**) (Pletsch *et al*., 1999; Nuñez *et al.,* 2004; Eapen y D' Souza, 2005; Perr *et al.,* 2006):

- Fitoextracción: proceso en el cual se usan plantas para acumular contaminantes del suelo en sus tejidos.
- Fitodegradación: se basa en el uso de plantas que puedan degradar contaminantes orgánicos.
- Rizofiltración: consiste en que las raíces de las plantas con alta tasa de crecimiento y área superficial absorban, concentren o precipiten metales provenientes de efluentes contaminados.
- Fitovolatilización: los contaminantes, como el mercurio y el selenio, son transportados de la raíz a las partes aéreas y ahí son volatilizados en formas menos tóxicas o menos peligrosas.
- Fitoestabilización: es el uso de plantas que puedan estabilizar, lignificar o humificar (formación de un complejo entre una sustancia orgánica o mineral con un ácido húmico) los elementos contaminantes en el suelo.
- Fitoestimulación: en este caso las plantas liberan sustancias que estimulan el crecimiento de los microorganismos de la rizósfera capaces de degradar los contaminantes presentes en el suelo.

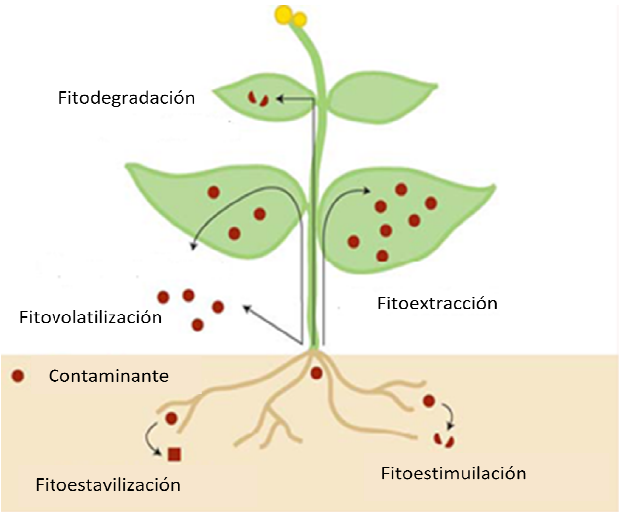


Figura. 4. Variantes del proceso de fitorremediación, según la estrategia de la planta para evitar efectos tóxicos provocados por los metales (Figura modificada de Pilon-Smith, 2005).

La elección de cualesquiera de estas tecnologías depende de la concentración y características de los contaminantes, así como de las propiedades de las plantas (Pilon-Smits, 2005). Sin embargo, en cualquiera de sus variantes, la fitorremediación es menos costosa, ambientalmente no destructiva y en algunos casos ofrece la posibilidad de recuperar el metal (Clemens *et al*., 2002; Yang *et al*., 2005).

Aunque la fitorremediación parece ser una estrategia prometedora en la remediación de suelos y agua, hay que tener en cuenta que también tiene algunas desventajas que pueden ser una limitante para alcanzar el éxito en el proceso de remediación en campo (Clemens *et al*., 2002), por ejemplo:

i) La mayoría de las plantas presentan crecimiento lento o su producción de biomasa es baja.

ii) En algunos casos no desarrollan un sistema radical profundo.

iii) No son tolerantes a concentraciones altas de contaminantes.

iv) Su capacidad para acumular grandes cantidades de contaminantes es baja. La poca biomasa de algunas plantas hiperacumuladoras es una de las grandes limitantes para que los proyectos de fitorremediación en campo sean totalmente exitosos, por lo que es necesario plantear alternativas biotecnológicas que nos permitan incrementar la biomasa de estas plantas.

Un aspecto de suma importancia en la fitorremediación es la disponibilidad del metal para las plantas y depende de las características del suelo, así como de la sustancia contaminante. Por ejemplo, el contenido de la materia orgánica, el tamaño de las partículas del suelo o el pH, siendo este último el factor físico-químico más importante; en valores de pH ácidos el zinc es más biodisponible debido a la solubilidad de coloides minerales y orgánicos (Mulligan *et al.,* 2001).

2.5 Metales pesados, sus efectos en la salud y los ecosistemas

No existe hasta ahora un acuerdo de cómo definir de manera adecuada a lo que comúnmente se conoce como metales pesados o “heavy metals”, la característica principal para clasificarlos es que debe tener una densidad mayor a 6 g/cm^3 (Alloway, 1995) pero este límite varía con los criterios del autor, otras definiciones resultan tan ambiguas como decir que son metales con alta densidad y que pueden llegar a ser tóxicos (Baird, 2001) o que tienen gran masa atómica (EPA, 1992). Además, bajo esta única definición se descarta por completo a elementos como los metaloides (ej. arsénico), que también son tóxicos en concentraciones bajas, sin embargo se suelen agrupar junto con los metales dentro de la categoría de metales pesados. Existen otras definiciones en términos del número atómico, otras que sólo se basan en la toxicidad del metal y otras no tienen una base química (Duffus, 2002). Dado que el

término de “metales pesados” no es adecuado se han propuesto algunas alternativas, una de ellas clasifica a los metales dentro de tres clases de acuerdo a las propiedades atómicas y la química de soluciones de los iones metálicos (Nieboer y Richarsond, 1980).

Los metales son elementos muy comunes en la naturaleza, 53 de los noventa elementos que ocurren de forma natural en el ambiente son metales (Benavides, *et al.,* 2005), pueden presentarse en varios estados de oxidación, un buen ejemplo es el cromo que se le puede encontrar en la naturaleza en estado trivalente (elemento esencial) o en estado hexavalente (muy tóxico). Algunos de ellos como el zinc, el cobre, el cobalto o el níquel son micronutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas. Sin embargo, en concentraciones altas pueden causar daños a los organismos que están en contacto con ellos. Por ejemplo en humanos pueden causar dermatitis o incluso cáncer. En plantas se ha observado un aumento en la peroxidación de los lípidos, daño al DNA, y la oxidación de grupos sulfhidrílo de proteínas (Taiz y Zeiger 1998). Además, los iones de los metales pesados se unen con facilidad a enzimas provocando una disminución en su actividad, pueden también causar daño oxidativo a los tejidos de las plantas o disminución en el contenido de clorofila de la hoja (Gallego *et al.,* 1996; Duruibe *et al*., 2007).

Ejemplos de metales pesados tóxicos son el plomo, mercurio, cromo, cobre, cadmio, zinc y el níquel. Éstos son considerados por la EPA de los Estados Unidos como los metales más peligrosos en la lista de contaminantes prioritarios (EPA, 2005). En los últimos años se ha incrementado considerablemente el uso de cobre, cadmio y zinc (Mulligan *et al*., 2001), por lo que es necesario encontrar alternativas eficientes para eliminar estos contaminantes de los ecosistemas.

2.6 Principales usos del zinc y su potencial efecto tóxico

El zinc es un micronutriente esencial para las plantas (Taiz y Zeiger, 1998), es el segundo metal de transición más abundante, se encuentra de forma natural en los tejidos de las plantas en concentraciones de entre 15 y 100 mg kg^{-1} de biomasa seca. Sin embargo, cantidades más altas son tóxicas para la mayoría de las plantas, causando inhibición del crecimiento de la raíz, clorosis (Krämer, 2005), reducción del crecimiento del tallo y de las hojas, entre otras cosas. Estos síntomas pueden ser causados por que la planta pierde su capacidad de producir suficientes cantidades de auxina (hormona presente de forma natural en las plantas que regula procesos como el tropismo, la elongación celular, la diferenciación vascular, la división celular y la ramificación lateral (Taiz y Zeiger, 1998). Para los humanos el zinc también es un elemento importante, es cofactor de más de 300 enzimas. Sin embargo, la ingestión en

exceso de este metal, puede causar entre otros trastornos: anemia, decremento en los niveles de colesterol, induce la deficiencia de cobre (promueve la síntesis intestinal de metalotioneina de cobre), inmunotoxicidad, efectos gastrointestinales, resequedad e irritación de la garganta, dolor de cabeza, fiebre y resfriados (EPA, 2005).

La fuente de emisión de zinc provocada por la actividad humana es de 20 a 1 con respecto a la fuente natural, ya que se emplea en el galvanizado de acero y en la metalurgia de metales preciosos, para separar la plata del plomo. Es resultado de la combustión del petróleo y del desperdicio de fertilizantes fosfatados; tan sólo las actividades de la industria minera emitieron 10 000 toneladas de Zn por año durante los últimos 200 años (Broadley *et al.,* 2007). Se considera que un suelo está contaminado con zinc cuando se excede la concentración de 150 ppm (Mulligan *et al.,* 2001).

2.7 Principales usos del cadmio y su potencial efecto tóxico

El cadmio es un metal pesado no esencial para las plantas (Taiz y Zeiger, 1998). La concentración de este metal en suelos no contaminados, es menor a 1 μgg^{-1} (Mulligan *et al.,* 2001), pero actualmente se puede encontrar en concentraciones altas debido a su producción en la industria metalúrgica (según el Informe de la Minería Mexicana (2006) durante el 2005 hubo una producción de más de 18 mil toneladas a nivel mundial) estaciones termoeléctricas, en la fabricación de pigmentos, en pilas de cadmio-níquel, en fertilizantes fosfatados y como estabilizador de plásticos como el PVC (Hansen y Lassen 2003). En México, se emitieron poco más de 38 toneladas de cadmio y 25 toneladas de compuestos con este metal en 2007, la mayoría de éstas llegaron al agua (RETC, 2007). Sin embargo, la fuente más importante de descarga de cadmio al medio ambiente es la quema de combustible fósil, la incineración de basura y lafundición de rocas para extraer zinc o plomo (Benavides *et al.,* 2005). Además, este metal es relativamente soluble en agua por lo que se encuentra en forma biodisponible, especialmente en valores de pH bajos entre 4.5 a 5.5 (Hansen y Lassen 2003 y Mulligan *et al.,* 2001).

Se sabe que el cadmio puede causar varias enfermedades en humanos; en exposiciones cortas se ha visto que provoca dermatitis, y con la exposición crónica llega a causar daño renal y posiblemente cáncer de pulmón (Yang *et al*., 2005, Hansen y Lassen, 2003). Las principales formas de intoxicación en humanos con este metal son: el consumo de alimentos y agua contaminados con cadmio, así como el fumar tabaco.

En plantas se ha visto que el cadmio afecta la apertura de estomas y la transpiración, inhibe a la enzima Fe III reductasa, con lo que se alteran los procesos de fotosíntesis. También causa alteraciones

en la membrana plasmática inducidas por la peroxidación de los lípidos, puede además reducir la actividad de enzimas involucradas en la fijación de CO_2, etc. (Benavides *et al*., 2003). La absorción de cadmio por las raíces parece estar en competencia por las mismas proteínas transmembranales para nutrientes como potasio, calcio, magnesio, hierro entre otros (Benavides *et al*., 2005).

Debido a los diversos efectos nocivos de metales pesados en exceso como el cadmio y el zinc en la salud humana y en general de los seres vivos, se hace necesario el uso de nuevas tecnologías, por ejemplo, aquellas basadas en especies vegetales con el propósito de remediar ambientes contaminados de manera eficiente y económica.

En este trabajo se usaron plantas de la especie *Arabidopsis halleri* ya que anteriormente se demostró que es una de las especies capaces de acumular grandes cantidades de cadmio y zinc en el brote y en la raíz (Bert *et al*., 2000 y Zhao *et al*., 2000).

2.8 Principales usos del níquel y su potencial efecto tóxico

El níquel (Ni) es el vigésimo segundo metal más abundante en la corteza terrestre, frecuentemente está asociado a rocas ígneas, pero también se puede encontrar como metal libre o en asociación con el hierro. La concentración natural de Ni en el suelo suele ser menor a 100 ppm y en la superficie del agua 0.005 ppm sin embargo, en suelos contaminados la concentración puede ser desde 26 000 ppm hasta 53 000 pmm en los suelos cercanos a las refinerías y en aguas contaminadas 0.2 ppm (Barceloux, 1999 y Chen *et al.* 2009).

El Ni es un elemento esencial para las plantas en concentraciones menores a 0.001 mg kg^{-1} de peso seco (Prieto *et al.* 2009). Forma parte importante del metabolismo del nitrógeno como cofactor de la ureasa y de las hidrogenasas y participa en el proceso de fijación de nitrógeno por bacterias. Su deficiencia resulta en la reducción de la germinación (Browns *et al.* 1987) en la acumulación de urea en las hojas y consecuentemente en la necrosis de la punta de la hoja, sin embargo, en concentraciones más altas se puede presentar clorosis y retardo en la absorción de nutrimentos o en la fotosíntesis (Taiz y Zeiger, 1998).

Ya que tiene características químicas similares a las de minerales esenciales como el Ca, Mg, Mn, Zn y Cu, compite con ellos por los transportadores, así que en concentraciones altas puede llegar a inhibir la absorción de estos nutrientes causando incluso deficiencia que puede llegar a provocar efectos tóxicos (Chen *et al*. 2009).

El Ni es uno de los metales más utilizados actualmente por la industria, ya que tiene valiosas cualidades de dureza, ductibilidad, estabilidad a altas temperaturas, resistencia a la corrosión, entre otras. Se usa principalmente en la fabricación de aceros inoxidables, aleaciones con hierro para la producción de monedas, herramientas, maquinaria, armamento, joyas y utensilios de uso doméstico, en la producción de pilas alcalinas níquel-cadmio, en catalizadores y equipos electrónicos. La demanda de este metal se ha incrementado en gran medidaque su precio se elevó 10 veces (Duda-Chodak y Blaszczyk, 2008).

La versaltilidad del Ni y sus amplias aplicaciones han provocado la contaminación del suelo y del agua. En México, durante 2007 se emitieron 157 toneladas de compuestos de Ni al agua, lo que lo convierte en el segundo contaminante con mayor descarga a las aguas residuales (RETC, 2008). Esto representa un gran riesgo, pues se utilizan aguas negras para regar cultivos agrícolas, se ha reportado que metales como el Ni son acumulados en plantas como maíz, alfalfa e incluso en los granos del trigo (Prieto *et al.* 2009).

La exposición prolongada a concentraciones altas de Ni son riesgosas para la salud humana. El consumo de agua y de alimentos es la principal vía de exposición para la población.

El metal es transportado principalmente por la albúmina pero también por la histidina o la α2-macroglobulina. Se ha reportado que concentraciones de 0.05 a 7.6 mM de $NiCl_2$ pueden afectar el equilibrio redox y estimular la apoptosis en células del epitelio oral (Trombetta *et al*. 2005), también puede causar dermatitis, fibrosis pulmonar, enfermedades cardiovasculares y de pulmón o cáncer en el tracto respiratorio (Duda-Chodak y Blaszczyk, 2008).

2.9 Mecanismos de tolerancia a metales y su bioacumulación en plantas

Las plantas hiperacumuladoras de metales tienen varios mecanismos para lograr el almacenamiento de metales en sus tejidos. Éstos van desde la movilización y captura del metal a partir del suelo, la compartamentalización y secuestro dentro de las raíces, la transferencia al xilema, la translocación del metal de las raíces a la parte aérea, hasta el almacenamiento en estructuras especializadas como las vacuolas (Clemens *et al*., 2002; Broadley *et al*., 2007). A continuación se explica brevemente cada uno de estos mecanismos:

- Movilización y captura del metal: se cree que la acidificación de la rizósfera y la liberación de carboxilatos ayudan a aumentar la biodisponibilidad de metales. Los microorganismos presentes

en la rizósfera y las asociaciones simbióticas (micorrizas), también contribuyen a incrementar la disponibilidad de los metales para las plantas y por tanto aumentar su acumulación.

- Secuestro del metal en las raíces: una vez que el metal está disponible, es absorbido por la pared de las células de la raíz, después es transportado al interior de la misma, en algunos casos los metales usan vías de transporte de micronutrientes esenciales (Zhao *et al*., 2006).
- Translocación del metal: una vez en las células de la raíz, los metales se unen a compuestos como la histidina, la nicotinamina o los ácidos carboxílicos como el ácido cítrico y málico. También se forman complejos entre los metales y pequeños péptidos conocidos como fitoquelatinas o con proteínas ricas en cisteínas llamadas metalotioneinas, disminuyendo así el carácter tóxico del metal (Zhao *et al*., 2000, Clemens, 2001). Después son transportados por proteínas transportadoras de membrana hasta el xilema como la AhHMA4, proteína perteneciente a la familia ATPasa de tipo P (Revisado en Krämer, 2010) y la proteína MTP3 (METAL TOLERANCE PROTEIN 3) que contribuyen a la tolerancia a zinc en los tejidos de *A. thaliana* (Arrivault *et al.,* 2006).
- Secuestro y almacenamiento: el almacenamiento del exceso de metales se da principalmente en la vacuola de las hojas a través de transportadores de membrana vacuolar como MTP1 (Clemens, 2002) y gracias a la complejación de los metales con ácidos orgánicos y amino ácidos (Clemens, 2001).

2.10 *Arabidopsis halleri*

Arabidopsis halleri, también conocida como *Cardaminopsis halleri,* pertenece a la familia Brassicaceae. Es una planta herbácea montañosa perenne de 20 a 65 cm de altura, que se propaga vegetativamente por estolones y es polinizada por un amplio grupo de insectos. Florece únicamente en verano durante los meses de junio a agosto. Esta especie crece preferentemente en suelos arenosos y oligotróficos y se le puede encontrar en el Centro y Este de Europa hasta el Norte de Rusia, en Japón y al Norte de Taiwán. Es una especie diploide (2n=16) (www.efloras.org, 2007). Además se sabe que las poblaciones de esta especie son capaces de tolerar y acumular concentraciones altas de cadmio y zinc (≥ 1% y 0.1 % de la materia seca, respectivamente) (Bert *et al*., 2000*;* Bert *et al*., 2002*;* Bert *et al*., 2003).

En este estudio se eligió trabajar con *A. halleri* por considerarse una especie hiperacumuladora de cadmio y zinc, elementos que son muy comunes en los sitios contaminados. Existen varios trabajos importantes sobre su capacidad de acumulación de estos metales, en comparación con otras especies

tiene una amplia distribución geográfica y tiene cercanía filogenética importante con *A. thaliana*, cuyo genoma está totalmente secuenciado. Aunque *A. halleri* es una especie hiperacumuladora de cadmio y zinc, su biomasa es muy reducida, lo que límita almacene grandes cantidades del metal. Una estrategia para solucionar este problema es incrementar su biomasa a través de la inducción de raíces pilosas con *Agrobacterium rhizogenes.*

2.11 *Alyssum lesbiacum*

Especie herbácea perteneciente a la familia *Brassicaceae*, es una de las 48 especies del género *Alyssum* capaces de hiperacumular Ni hasta en un 3% en la parte aérea (peso seco). En un análisis de ejemplares de herbario de más de 150 especies del género *Alyssum*, se encontró una concentración de 22 400 μgg^{-1} en peso seco de Ni en tejidos de *A. lesbiacum* y, fue una de las especies con mayor contenido de este metal (Brooks*et al*., 1979), de ahí el gran interés en esta especie con fines de fitorremediación. Estas especies se distribuyen en suelos ultramáficos ricos en Ni (pueden llegar a tener más de 7 000 $mgkg^{-1}$) del Sur de Europa, el Este del mediterráneo y Asia Menor (**Figura 5**) (Kidd *et al*., 2007).

A. lesbiacum también es capaz de tolerar concentraciones altas de Ni, presentando sólo una reducción significativa en su crecimiento (50%) cuando está expuesta a 1mM de Ni en la solución hidropónica. Para que *A. lesbiacum* pueda tolerar concentraciones altas de Ni en sus tejidos debe ocurrir la translocación del metal desde la raíz a la parte aérea. Se ha reportado que la histidina está involucrada en el mecanismo de tolerancia y en el transporte del Ni al xilema para luego ser translocado a la parte aérea (Krämer *et al*. 1996; Ingle *et al.* 2005).

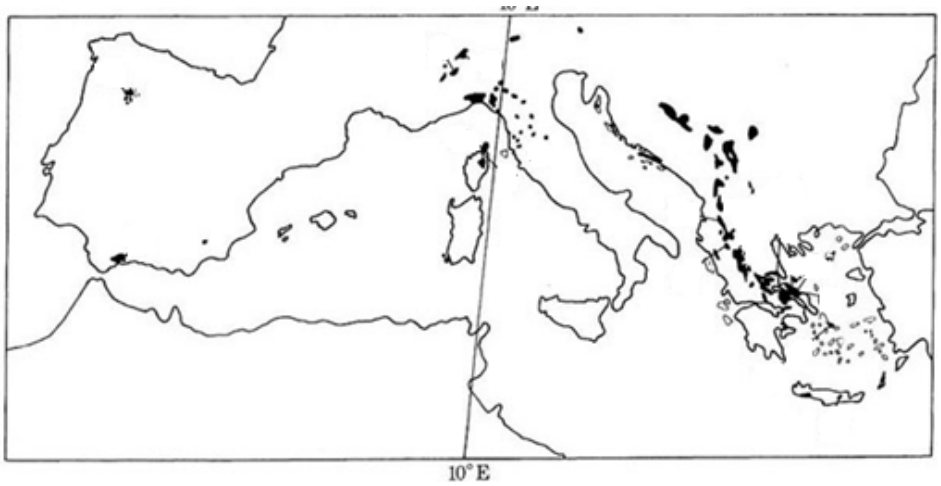


Figura 5. Distribución geográfica de especies hiperacumuladoras de *Alyssum* (con una concentración superior a 1000 mg/kg peso seco). Las áreas oscuras indican rocas ultrabásicas (Brooks *et al*., 1987, revisado en Kidd et al. 2007).

La compartamentalización es una más de las estrategias desarrolladas por las plantas para combatir el efecto tóxico de los metales. A través de un análisis de microscopía electrónica combinada con microanálisis de rayos X se encontró que en hojas de varias especies del género *Alyssum* el Ni se acumula principalmente en las células de la epidermis lejos de los estomas ; se encontró también que en las células guarda y los tricomas exudan el metal (Psaras *et al*., 2000), mientras que en el tallo de plantas de *A. lesbiacum* el Nil se acumula principalmente en el interior de las células acompañantes entre el cilindro vascular y las células del córtex (Küper *et al*., 2001). Broadhurst y colaboradores encontraron que de manera simultánea se acumulan en la base de los tricomas además de Ni, Mg y Ca (Broadhurst *et al.,* 2004). Mediante un microanálisis de rayos X de energía dispersiva (EDXA) se demostró que la compartamentalización de Ni en esta especie se da en las vacuolas de las células epidérmicas y es consistente con otros trabajos donde se encontró que existe un segundo pico de acumulación en las células acompañantes entre el cilindro vascular y las células del parénquima, tanto en tallos como en hojas, pero reportan que hay exclusión de Ni en los tricomas (Küpper *et al*. 2001). Es posible que la variación entre los resultados de estos trabajos se deba a que son utilizados diferentes métodos de análisis y se usan plantas en diferentes estadios de desarrollo y además usan diferentes concentraciones de Ni en solución. Existen numerosos trabajos que intentan explicar los mecanismos de acumulación de *A. lesbiacum*, incluso se ha reportado que existe un mecanismo secundario para la acumulación de Ni en la vacuola, se sugiere que se trata de transporte activo secundario probablemente un mecanismo de antiporte de Ni^{2+}/H^{+} en el tonoplasto de *A. lesbiacum* (Ingle *et al*., 2008).

La gran importancia que se le da a la recuperación de sistemas contaminados con níquel está fuertemente influenciada por la posibilidad de recuperar el metal, lo que se conoce como fitoextracción. Se estima que remediar un suelo contaminado con níquel es mucho más lucrativo que establecer un cultivo tradicional. Por ejemplo, la cosecha de pastos de baja calidad o un bosque darían ganancias aproximadamente de 50 a 100 dolares por héctarea por año, en cambio un cultivo de fitoextracción podría producir hasta 400 kg de Ni por hectárea con un valor de 2 000 dólares, incluso con los subproductos se pueden sobrepasar los 3 000 dólares por hectárea (http://www.ars.usda.gov).

2.12 Inducción de raíces pilosas por *Agrobacteruium rhizogenes*

Las raíces pilosas se desarrollan en consecuencia a la infección de la bacteria *Agrobacterium rhizogenes.* La transformación de plantas, en su mayoría dicotiledóneas, por la bacteria es un fenómeno que se presenta de manera natural.

Este microorganismo infecta y transforma las plantas que han sufrido algún daño mecánico (Pletsch *et al*. 1999, Tzfira y Citovsky, 2002) y provoca una producción masiva de raíces con numerosos pelos radicales, conocidas como raíces pilosas ("hairy root") (Shanks y Morgan, 1999; Nilsson *et al.*, 1997). *A. rhizogenes* es una bacteria fitopatógena, Gram-negativa que vive en el suelo, se caracteriza por poseer un plásmido llamado Ri ("root inducing") de aproximadamente 200 Kb donde se encuentra la región de virulencia (vir) y el DNA de transferencia (T-DNA). Esta región tiene los genes responsables de la formación de raíces pilosas y de la producción de derivados de azúcares y aminoácidos llamados opinas. Cuando el T-DNA se incorpora al genoma de la planta, las células vegetales comienzan a sintetizar opinas, aminoácidos, que son excretadas al ambiente para ser usadas por la bacteria como fuente de carbono y nitrógeno (Madigan *et al.,* 2001; Chi *et al*., 2004). Para que la infección tenga lugar, la planta debe sufrir algún tipo de herida con lo que libera fenoles que son reconocidos por la bacteria, y así se adhiere a la célula huésped. Una vez en la célula vegetal, se activan proteínas codificadas por la región *vir* y permiten la síntesis de una cadena simple llamada cadena T a partir del T-DNA, formándose un complejo de proteínas Vir, que actúan como puente que permite la transferencia de la cadena T desde el citoplasma de la bacteria al de la célula vegetal.

Una vez aquí, se forma un complejo T maduro que es transportado del citoplasma al núcleo con ayuda de proteínas de la célula vegetal. La integración del complejo T está mediado tanto por proteínas Vir como por factores de la célula huésped (Tzfira y Citovsky, 2002; Zupan y Zambryski, 1995).

Hoy en día este proceso de infección, que se da de forma natural es aprovechado con fines biotecnológicos muy variados, por ejemplo, la obtención de metabolitos secundarios.

2.13 Raíces pilosas como modelo de estudio de la tolerancia a metales y su bioacumulación en plantas

Las raíces pilosas tienen varias características que las hacen muy útiles en biotecnología vegetal: presentan crecimiento rápido, estabilidad genética y bioquímica, crecen en medios de cultivo libres de hormonas y pueden ser propagadas fácilmente, por lo que son ampliamente usadas para la obtención de metabolitos secundarios, y también en la producción de anticuerpos monoclonales y para regenerar plantas transgénicas (Shanks y Morgan, 1999). También han sido propuestas como modelo de investigación y desarrollo de métodos de fitorremediación como la fitotransformación, la fitoestimulación, la rizofiltración y la fitoextracción, debido a que las raíces también acumulan metales (Pletsch *et al*., 1999). Se ha demostrado que *Arabidopsis halleri* es una planta tolerante e hiperacumuladora de cadmio y

zinc (Bert *et al*., 2000 y Zhao, *et al*., 2000) y la inducción de raíces pilosas incrementa su biomasa y se mantiene la capacidad de la especie de acumular metales independientemente de la parte aérea (Sánchez Izquierdo, 2008), una característica necesaria en procesos de fitoremediación. En este trabajo se usó la raíz transformada de *A. halleri*y de *Alyssumlessbiacum* con el fin de usar los cultivos de raíces pilosas como filtros biológicos de aguas contaminadas

Se han realizado numerosos estudios con raíces pilosas de diferentes especies capaces de hiperacumular metales, con el fin de entender los procesos que permiten a estas plantas sobrevivir en estas condiciones. Tepfer y colaboradores en 1989 observaron que raíces pilosas de *Calystegia sepium* sobreviven en lodos residuales por largos periodos y que pueden ser puestas directamente en el suelo donde detienen su crecimiento pero mantienen su actividad metabólica.

Otro estudio mostró que cultivos de raíces pilosas de *Thlaspi caerulescens* expuestos a 100 ppm de Cd acumularon 10 600 $\mu g g^{-1}$ (peso seco). Es de hacerse notar que en experimentos a corto plazo se observó que la acumulación de Cd se dio en los primeros 30 minutos de exposición con el metal (Nedelkoska y Doran 2000).

En el 2001 se reportó que raíces pilosas de *A. bertoloni* eran capaces de tolerar y acumular Ni independientemente de la parte aérea. Raíces que crecieron en concentraciones de 20 a 100 mg kg^{-1} de Ni acumularon más de 7 200 mg kg^{-1} peso seco (Nedelkoska y Doran 2001).

También se ha reportado que en raíces pilosas de *T. caerulescens* y de *Alyssum bertoloni* la mayor parte del Cd y Ni (respectivamente) está en forma libre y no asociado a ácidos orgánicos, como el ácido cítrico el ácido malónico o el ácido málico. En las raíces de *T.caerulescens* y en *Nicotiana tabacum* la mayor parte del cadmio se encontró en la pared celular mientras que el Ni en *A. bertolonii* and *N. tabacum* se encontró principalmente en el simplasto, también se observó que la tolerancia de *T.caerulescens* al Cd y su hiperacumulación no está afectada por la alteración de gradientes de protones, sin embargo en las raíces de *A. bertolonii* se encontró que la inhibición de la H^+-ATPasa restringe la entrada de Ni a través de la membrana, lo que resulta en un incremento de la cantidad de Ni en la pared celular (Boominathan y Doran, 2003).

En un trabajo previo se demostró que raíces pilosas de *A. halleri* son capaces de tolerar concentraciones altas de zinc (2000 μM) sin efectos significativos en su crecimiento.También se observó que pueden tolerar concentraciones altas de Cd (2000 μM), sin embargo, su crecimiento se detiene por completo.Finalmente se reportó también que las raíces pilosas de esta especie pueden acumular hasta 22 863 mg de cadmio kg^{-1} de peso seco pero no acumularon una cantidad suficiente de zinc para ser

consideradas hiperacumuladoras. Interesantemente, a corto plazo (24 h) se acumula también una concentración significativa de Cd y Zn en las raíces (Sánchez,I, 2008).

Un aspecto importante es la acumulación en la pared celular. A este respecto, Nedelkoska y colaboradores en el año 2000 demostraron que más de del 60% del cadmio total acumulado por la raíz se encontraba en la pared celular de las raíces después de 21 días de tratamiento. Ellos sugieren que se trata de un mecanismo de defensa contra los efectos tóxicos del Cd que permite la activación de los procesos de detoxificación dentro de la célula (Nedelkoska y Doran 2001).

3. HIPÓTESIS

- Las raíces pilosas de especieshiperacumuladoras de metales pueden sobrevivir y mantener sus propiedades de acumulación en condiciones no estériles cuando están expuestas a aguas que contienen concentraciones altas de metales.

4. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el potencial de las raíces pilosas de dos especies hiperacumuladoras de metales, para su posible uso como filtro biológico en condiciones no estériles con fines de fitorremediación de aguas contaminadas.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

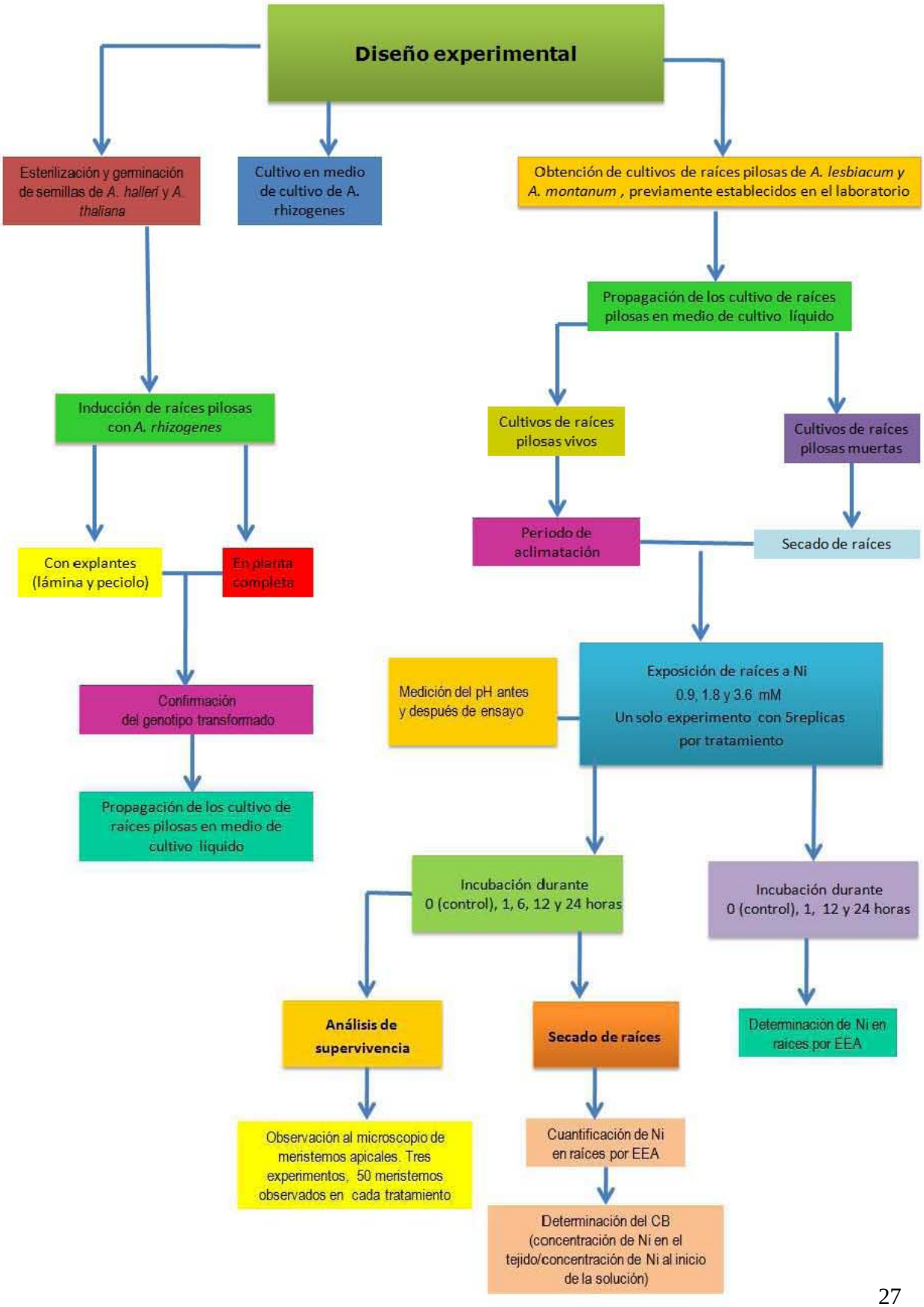
- Establecer un protocolo eficiente para la inducción y establecimiento en cultivo *in vitro* de raíces pilosas de *Arabidopsis halleri* usando *A. rhizogenes*.
- Determinar la **supervivencia** de las raíces pilosas de la especie hiperacumuladora de Ni, *Alyssum lesbiacum* y de una especie no hiperacumuladora *Alyssum montanum* expuestas a a una solución con diferentes concentraciones de Ni, en condiciones no estériles.
- Determinar la capacidad de **bioacumulación** de Ni de las raíces pilosas de *A. lesbiacum y A. montanum* expuestas a una solución con diferentes concentraciones de Ni.

- Evaluar la capacidad de **bioadsosrción** de la biomasa seca generada a partir de cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum y A. montanum* expuestas a una solución con diferentes concentraciones de Ni.

6. METODOLOGÍA

6.1 Diseño esperimental

Con el fin de falicitar la comprensión del diseño experimental planteado en este trabajo, se presenta un diagrama general donde se indica la secuencia de cada uno de los ensayos realizados.


Diseño experimental
Esterilización y germinación de semillas de A. halleri y A. thaliana
Cultivo en medio de cultivo de A. rhizogenes
Obtención de cultivos de raíces pilosas de A. lesbiacum y A. montanum , previamente establecidos en el laboratorio
Propagación de los cultivo de raíces pilosas en medio de cultivo líquido
Inducción de raíces pilosas con A. rhizogenes
Cultivos de raíces pilosas vivos
Cultivos de raíces pilosas muertas
Con explantes (lámina y peciolo)
En planta completa
Periodo de aclimatación
Secado de raíces
Confirmación del genotipo transformado
Medición del pH antes y después de ensayo
Exposición de raíces a Ni 0.9, 1.8 y 3.6 mM Un solo experimento con 5replicas por tratamiento
Propagación de los cultivo de raíces pilosas en medio de cultivo líquido
Incubación durante 0 (control), 1, 6, 12 y 24 horas
Incubación durante 0 (control), 1, 12 y 24 horas
Análisis de supervivencia
Secado de raíces
Determinación de Ni en raíces por EEA
Observación al microscopio de meristemos apicales. Tres experimentos, 50 meristemos observados en cada tratamiento
Cuantificación de Ni en raíces por EEA
Determinación del CB (concentración de Ni en el tejido/concentración de Ni al inicio de la solución)

6.2 Material biológico

Con el fin de inducir raíces pilosas se usaron semillas de *Arabidopsis halleri*, hiperacumuladora de Zn y Cd (donada por Pierre Saumitou-Laprade, Universidad de Lille, Francia) y semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0, especie no hiperacumuladora de metales. Para la inducción de raíces pilosas se usó la cepa de tipo silvestre A4 de *A. rhizogenes.* Se usaron también cultivos de raíces pilosas (establecidos con anterioridad en el laboratorio del Dr. J. Doubrovsky) de la especie hiperacumuladora de níquel *Alyssum lesbiacum* (semillas donadas por Alan Baker, Universidad de Melbourne Parkville, Australia) *y* con el fin de comparar está capacidad de acumulación se usó a la especie no acumuladora *Alyssum montanum* (planta de uso ornamental, cuyas semillas fueron adquiridas en un centro comercial). Las especies del género *Alyssum* se utilizaron en los ensayos de bioacumulación y bioadsorción.

6.3 Condiciones de crecimiento

Las semillas esterilizadas de *A. halleri y A. thalina* se sembraron por separado en cajas de Petri con medio sólido MS (Murashige & Skoog, medio basal modificado, pH ajustado a 5.7) al 0.2 X con 1% sacarosa y 0.8% de agar. Las plantas se cultivaron en cajas orientadas verticalmente a 22 °C y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Después de 15 días las plántulas se trasplantaron a frascos con el mismo medio de cultivo, para obtener plantas más grandes y usar explantes de hoja y pecíolo o la planta completa para la transformación con *A. rhizogenes*.

6.4 Inducción de raíces pilosas

La bacteria *Agrobacterium rhizogenes* se inoculó en medio YM líquido pH 7 (Apéndice I), con 50 μgml^{-1} de rifampicina, el cultivo se mantuvo por 48 horas en agitación orbital a 120 rpm. Se midió la densidad del cultivo bacteriano, con ayuda de un espectrofotómetro y se registró la absorbancia a 600 nm, siendo el intervalo óptimo para la transformación 0.5-0.8 D.O. ($1x10^5$ a $1x10^8$ células por ml), ya que se ha visto que en esta densidad se obtienen mejores resultados en la transformación de las plantas por la bacteria (Chávez *et al.,* 2003). Cuando la densidad del cultivo bacteriano se encontraba en el intervalo óptimo (48 hrs. de cultivo), se comenzó la inducción de las raíces pilosas.

Para la transformación de plantas de *A. halleri* con *A. rhizogenes* se establecieron dos protocolos: el primero consistió en cortar explantes (hojas y peciolos) de las plantas completas y hacer en ellas

pequeñas incisiones. Los explantes con heridas se incubaron en 20 ml del cultivo bacteriano durante 40 minutos. Transcurrido este tiempo los explantes fueron retirados del cultivo bacteriano y se colocaron en cajas de Petri con medio MS 1X y 1% de sacarosa, en condiciones de oscuridad a 22 °C durante 2 días con el objetivo de mantener el co-cultivo. Al término de este tiempo, los explantes se lavaron con el antibiótico cefotaxima 50 μg ml^{-1} y se traspasaron a cajas de Petri con medio MS 1X con 3 % de sacarosa, 0.8 % de agar y cefotaxima (400 μg ml^{-1}). En el segundo protocolo utilizado se usaron las plantas completas, es decir que no se cortaron explantes, sólo se realizaron pequeñas heridas en el tallo y los peciolos de las plantas, y con ayuda de un asa de cultivo la bacteria se inoculó en las heridas. En este caso no se lavaron las plantas con el antibiótico, sólo después de dos días de co-cultivo las plantas completas se transfirieron a frascos con medio de cultivo MS 1X con 3 % de sacarosa, 0.8 % de agar y cefotaxima (400 μg ml^{-1}). Después de tres semanas aproximadamente, las raíces que emergieron de los explantes o de las plantas se cortaron y se traspasaron a cajas de Petri con MS 1X con 3 % de sacarosa, 0.8 % de agar y cefotaxima (400 μg ml^{-1}). Fue necesario cambiar el cultivo de raíces a una caja con medio nuevo al menos en tres ocasiones antes de confirmar la transformación de las raíces a través del análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), esto con el objetivo de asegurar la eliminación total de la bacteria y así evitar falsos positivos.

6.5 Confirmación del genotipo transformado

Para asegurar la naturaleza transformada de la raíz pilosa de *A. halleri* se recurrió al análisis de PCR y así se verificó que el T-DNA de la bacteria se integró al genoma de la planta. Para poder llevar a cabo este análisis se extrajo DNA genómico de las raíces siguiendo el protocolo de extracción con CTAB 2x (Apéndice II) (Lukowitz, *et. al.* 2000). El tejido de raíces necesario para la extracción se obtuvo en condiciones de esterilidad para permitir que el cultivo continuara creciendo y en caso de estar transformada empezar su propagación en medio de cultivo líquido.

En este caso se usaron los oligonucleótidos *rol B1* y *rol B2* (5`-ACTATAGCAAACCCCTCCTGC-3 y 5`-TTCAGGTTTACTGCAGCAGGC-3`) para amplificar un fragmento de 652 pb del gen *rolB* de *A. rhizogenes* (Bonhomme *et al*. 2000).La reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 µl de reacción: $MgCl_2$ 3 mM, dNTPs 0.2 mM, oligo *rol B1* 50 pM, oligo *rol B2* 50 pM, amortiguador 1x, ADN polimerasa (Taq pol) 1 U/µl, H_2O mili Q 18 µl, y 1µl de DNA genómico. La reacción de PCR se llevó a cabo en el termocicladordurante 30 ciclos, por 1.30 minutos a una temperatura de 94°C para desnaturalizar el DNA, a 63° C por 1.30 minutos para alinear el DNA y a 72° C por 2 minutos para la amplificación del fragmento

*rol*B. Los productos de la amplificación se observaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.4%. El gel se preparó usando amortiguador TBE 1X (Apéndice III) que también se usó en la cámara de electroforesis. Se usó un marcador molecular de 1 Kb. El gel se corrió a 58 mA durante 50 minutos y se tiñó con bromuro de etidio. Los resultados se observaron con ayuda de un transluminador de luz UV.

6.6 Cultivo de raíces pilosas

Los cultivos de raíces transformadas se subcultivaron en cajas de Petri con medio sólido MS 1X suplementado con 3 % de sacarosa, 0.8 % de agar y cefotaxima (400 µg ml^{-1}).

Posteriormente, una parte del cultivo en medio sólido se traspasó a matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio líquido MS 1X con 3 % de sacarosa y cefotaxima (400 µg ml^{-1}), para evitar que la bacteria proliferara de nuevo y así evitar una posible contaminación. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de oscuridad y en agitación orbital (100 rpm) a 21 °C.

6.7 Exposición de las raíces pilosas de *A. lesbiacum* a níquel

6.7.1 Ensayo de bioacumulación

Con el fin de conocer la capacidad de acumulación de Ni de las raíces pilosas de *A. lesbiacum* y *A. montanum*, en condiciones no estériles, sin sacarosa y en una solución baja en sales minerales, los cultivos que fueron cultivados en medio líquido MS 1x con 3 % de sacarosa, sin reguladores de crecimiento, fueron sometidos a una fase de aclimatación anterior a los experimentos, con el fin de "preparar" a las raíces para la fase experimental.

La etapa de aclimatación consistió en disminuir paulatinamente la concentración de sacarosa y sales minerales, así que los cultivos se transfirieron a medio de cultivo MS 0.5x y 1 % de sacarosa, después fueron puestas en medio MS 0.25x y 0.5 % de sacarosa y finalmente se transfirieron a medio MS 0.1x y 0.3% de sacarosa, cada fase por 12 hrs.

Concluida esta etapa se pesaron aproximadamente 2 gramos de tejido fresco, quitando el exceso de medio con ayuda de papel filtro por dos minutos. El tejido ya pesado fue expuesto a una segunda etapa de aclimatación. Esta fase consistió en mantener las raíces pilosas de *A. lesbiacum* y *A. montanum* en la solución de agua destilada con una concentración mínima del medio de cultivo Hoagland (0.01x)

durante una hora.Transcurrido este tiempo los cultivos se incubaron por 0 (control), 1, 6, 12 y 24 horas en medio Hoagland (0.01x) con 0.9, 1.8 y 3.6 mM (52.82 mg L^{-1}, 105.64 mg L^{-1} y 211.28 mg L^{-1}, respectivamente) de sulfato de níquel ($NiSO_4$) en condiciones de oscuridad y agitación 100 rpm a 21 °C. Al término del cultivo las raíces se lavaron con agua milliQ, posteriormente con EDTA 50mM, y se enjugaron con agua milliQ dos veces, cada lavado por dos minutos con el fin de eliminar los metales que quedaron adheridos a la superficie de la raíz. Los cultivos se secaron durante 7 días a 62 °C y se registró el peso seco de cada cultivo. Se realizó un experimento con 5 replicas para cada tratamiento.

Para conocer el efecto del la concentración de Ni en la solución así como el periodo de exposición se registro el valor del pH al inicio y al final de cada tratamiento. El pH inicial de la solución con níquel fue de 6 ± 0.30 y no se usó algún agente amortiguador.

6.7.2 Ensayo de bioadsorción

Con el propósito de evaluar la capacidad de las raíces pilosas de *A. lesbiacum y A. montanum* como bioadsorbentes a diferentes tiempos y concentraciones de níquel, las raíces fueron lavadas con abundante agua milliQ. Se realizaron tres lavados de tres minutos cada uno para retirar los excesos de sacarosa y nutrientes provenientes del medio de cultivo donde fueron cultivadas las raíces.

Ya que el objetivo principal de este ensayo fue evaluar la capacidad de adsorción de las raíces pilosas fue necesario secar las raíces a 62 °C durante 7 días para así garantizar que el níquel sólo se adhiere a la pared celular y no está siendo trasportado al interior de la célula.

Una vez secos los cultivos de raíces pilosas de ambas especies, se pesaron 0.250 ± 0.010 mg y se incubaron por 0, 1,12 y 24 horas en medio Hoagland (0.01x) con 0.9, 1.8 y 3.6 mM de sulfato de níquel ($NiSO_4$) en condiciones de oscuridad y agitación 100 rpm a 21° C.

Al cabo de cada periodo de exposición, los cultivos fueron retirados de la solución y sin lavar se les retiró el exceso de agua con ayuda de círculos de papel filtro para después secarlos por 12 horas a 62 °C y así eliminar el exceso de agua. Se registró el peso final y se guardaron los cultivos para su posterior procesamiento y determinación del níquel adsorbido.

Durante este ensayo también se registraron los valores de pH de la solución con Ni al inicio y al termino de cada tratamiento.

6.8 Comparación de la supervivencia del meristemo apical de la raíz

Con el objetivo de determinar la concentración máxima de metales donde las raíces pilosas presentan la mayor supervivencia, se expusieron cultivos de raíces a una solución con 0, 0.9, 1.8 y 3.6 mM de Ni durante 24 horas (bajo el supuesto de que en este periodo máximo de exposición a Ni las raíces presentarán los mayores signos de toxicicidad reflejados en el porcentaje de supervivencia), incubadas a 21 °C y en agitación orbital a 100 rpm.

Después del periodo de exposición, fueron seleccionadas de cada cultivo 50 raíces; estas seleccionadas se mantuvieron durante 20 minutos en una solución de CFDA (6-carboxifluorecseina diacetato) 5 µg ml^{-1} (Goodall y Jonson, 1982). Después se lavaron con agua destilada para retirar los excesos del fluorocromo y se montaron en portaobjetos con un poco de agua y se observaron en el microscopio de epiflorescencia a una longitud de onda de emisión de 488 nm, usando el objetivo 20x. Se analizaron los meristemos apicales de las raíces laterales.

Se eligió este fluorocromo porque entra libremente en las células, y sólo en aquellas que están vivas se da una conversión enzimática donde las esterasas intracelulares hidrolizan el CFDA provocando la conversión a un fluoróforo hidrofílico (Dive *et al.,* 1988).

6.9 Digestión del material vegetal en horno de microondas

Para determinar la cantidad de metales acumulados por las raíces pilosas se llevó a cabo una pre-digestión ácida con una mezcla de ácido nítrico y peróxido de oxígeno en una relación 1:4 (v/v), grado trazas (70% redestilado 99.999%) durante una hora. Las digestiones se realizaron en vasos de teflón que posteriormente se pusieron en un horno de microondas (MARS 5/X CEM Corp.) (Apéndice IV). Cada corrida en el microondas consistió en doce muestras, un blanco y un estándar de referencia de hoja de espinaca (NIST 1570 a). Posteriormente todas las muestras se filtraron con membranas de un tamaño de poro de 0.02 mm (método modificado de EPA 3015A, 2001). Todo el material usado para este fin se lavó con agua desionizada y jabón de laboratorio libre de fosfatos y se remojó por un periodo mínimo de 24 horas en agua acidulada (ácido nítrico 10%) y enjuagado después con agua desionizada.

6.9 Determinación de la concentración total de metales

Se determino la concentración de Ni sólo en en los tejidos de las raíces, medianteun espectrofotómetro de absorción atómica de alto rendimiento PerkinElmer AAnalyst™ 800 (EAA) por el método de atomización Técnica de Flama (FLAA), para concentraciones altas o por la técnica de horno de grafito (THGA) para concentraciones bajas (EPA7000B y EPA 7010, 2007).

El espectrómetro se calibró con un estándar certificado de níquel . Los resultados se usaron para determinar el coeficiente de bioacumulación (CB) de las raíces pilosas usando la siguiente ecuación (Dushenkov *et al*. 1995):

$$\mathrm{CB} = \frac{\text{Cantidad de metal en el tejido}}{\text{Cantidad del metal en el medio al inicio del cultivo}}$$

6. 11 Controles de calidad

Con el fin de conocer la exactitud y el sesgo de los métodos de digestión ácida del material vegetal y de cuantificación de metales en la biomasa, se recurrió al uso de varios controles de calidad. Durante la digestión de las raíces se incluyó además de las muestras, un blanco de reactivo o blanco de método, que incluyó el ácido nítrico y peróxido de oxígeno sin muestra, los valores del blanco se restaron a los obtenidos para cada muestra, también con el valor del blanco se calculó el límite de cuantificación y el límite de detección del EAA. Se usó un estándar de referencia de hoja de espinaca (NIST 1570 a) en cada una de las corridas en el microondas, para estimar el porcentaje de recuperación, el valor promedio fue 98% (EPA, 7000B, 2007).

6.12 Análisis estadístico

Los datos se transformaron a Log_{10} (Y+1) de acuerdo a los resultados de las pruebas de distribución normal (Shapiro Wilk) y de homogeneidad de varianzas (Bartlett). El porcentaje de supervivencia del meristemo apical se transformó mediante la función Arcoseno. Los datos de supervivencia del meristemo apical, así como los de acumulación de Ni por parte de las raíces de *A. lesbiacum* y *A. montanum* se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. El modelo incluyó el efecto de los

factores principales y la interacción. De resultar significativo el modelo se compararon las medias mediante la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Se realizó un análisis de correlación lineal de Pearson para: 1) determinar los cambios en el pH de la solución de $NiSO_4$ después de la exposición de las raíces a cada concentración de la solución y 2) para evaluar la capacidad de acumulación del Ni por parte de las raíces después del tiempo de exposición a la solución de Ni. Las variables analizadas fueron el tiempo de permanencia de las raíces (1, 6, 12 y 24 h) y la molaridad de la solución de $NiSO_4$ (0.9, 1.8 y 3.6 mM). Con la intención de encontrar una relación funcional entre el tiempo de exposición a cada concentración de la solución y el coeficiente de absorción de Ni en las raíces en las especies evaluadas se realizaron análisis de regresión lineal. En todos los casos se consideró un nivel de $p<0.05$ como significativo. El análisis estadístico se realizó con el programa Prism 5 (Graphpad Software, Inc.).

7. RESULTADOS

7.1 Protocolo de inducción de raíces pilosas

Se incrementó la biomasa de las raíces de *A. halleri*, mediante la transformación de las plantas con *A. rhizogenes*. Como se muestra en la **Figura. 6A**, después de tres semanas de cultivo, las hojas permanecen verdes y turgentes. Las raíces emergen de las incisiones hechas tanto de la lámina como del pecíolo de las hojas. Fenotípicamente se observó que las raíces presentaban un número excesivo de pelos radicales, característica principal de las raíces pilosas (**Figura 6A**).

Las raíces que emergieron de las hojas se cortaron a los 3 ó 4 días después de haber emergido o hasta que alcanzaron un tamaño considerable para que continuaran su crecimiento en medio sólido.

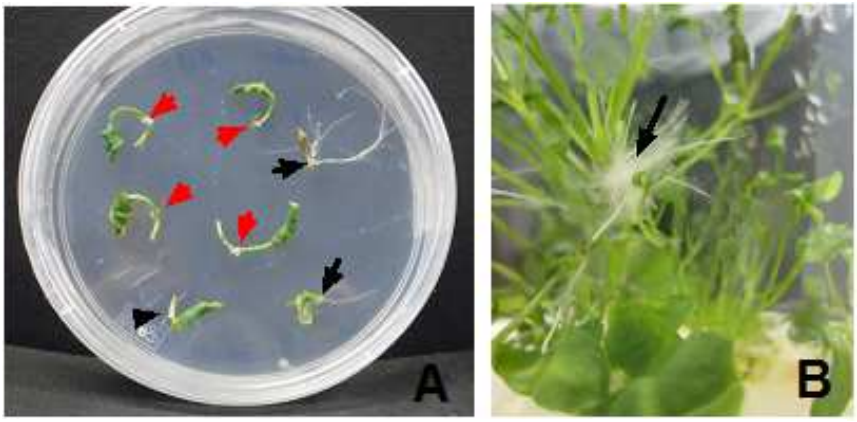


Figura 6. Emergencia de las raíces a partir de hojas (laminas y peciolos) (A) o a partir de tallos de plantas completas (B) de *A. halleri*. Las flechas negras indican la emergencia de raíces pilosas y las flechas rojas la formación de callo.

Sin embargo, a pesar de la emergencia de raíces a partir de los explantes (lámina y peciolo) no se pudo confirmar la naturaleza transgénica de las raíces debido a que no se obtuvo la biomasa necesaria para el análisis. Por ello se decidió utilizar un método diferente de inducción de raíces pilosas que consistió en hacer las incisiones a lo largo del tallo de plantas completas de *A. halleri.* Con este método se consiguió un mayor número de raíces con un gran número de pelos radicales (**Figura. 6b**), característica fenotípica de las raíces pilosas, aunque tomo al menos 8 meses poder tener suficiente biomasa. Estas raíces presentaban el fenotipo de raíces pilosas y posteriormente se confirmó la inserción del T-DNA de la bacteria al genoma de la planta por el análisis de PCR.

7.2 Confirmación del evento de transformación

Con el propósito de asegurar que el T-DNA de plásmido R_i de *A. rhizogenes* estuviera presente en los tejidos de *A. halleri*, se hizo el análisis de PCR. Es importante decir que este análisis se realizó para todas las raíces provenientes de diferentes explantes después de haber sido subcultivadas en al menos 4 ocasiones, para así evitar el crecimiento de la bacteria, con lo cual se garantiza que no hubo falsos positivos. En este caso se usó un control positivo correspondiente a un fragmento de DNA de un vector binario A4/pESC4, de 652 pb. Como control negativo se usó DNA de raíces que no sufrieron el evento de transformación. Como se ve en la **Figura 7**, las bandas del DNA de las raíces transformadas corresponden a la banda del control positivo, lo que indica que el T-DNA de la bacteria está presente en las raíces, con lo cual se agura que se trata de cultivos de raíces genéticamente transformadas. Con estos resultados, se puede decir que el protocolo usado para la transformación de plantas de *A. halleri* es eficiente y no hay necesidad de probar otras formas de transformación ni el uso de inductores como la acetosiringona (compuesto fenólico liberado por la planta como respuesta a una herida, que induce la activación de los genes *vir*) (revisado en Giri y Narasu, 2000).

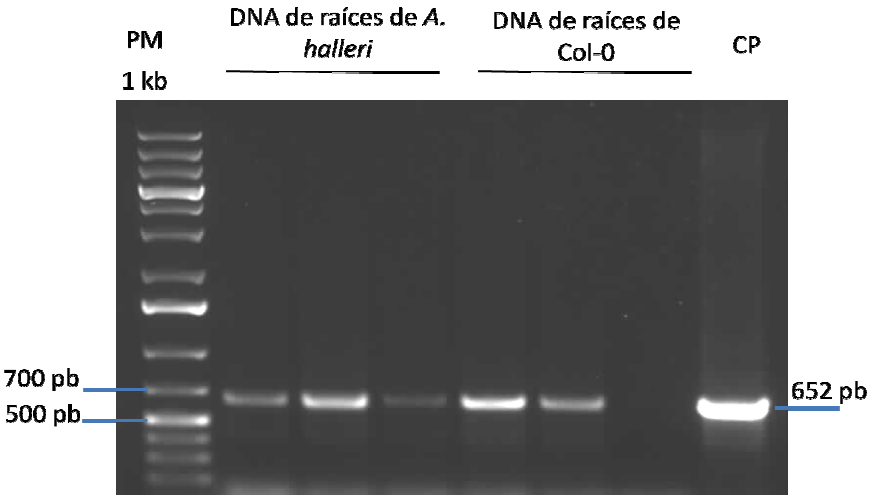


Figura 7. Confirmación de la transformación de los tejidos de raíces pilosas de *A. halleri* a través del análisis de PCR. (CP) control positivo corresponde a DNA de la bacteria, carril 2-4 muestras de DNA de raíces de *A. halleri* y carriles 6-7 muestras de DNA de raíces de *A. thalina*.

7.3 Cultivos de raíces pilosas

Una vez que se confirmó la integración del T-DNA de la bacteria en las raíces se comenzó su propagación en medio sólido. Posterioremente las raíces fueron propagadas en medio líquido. Sin embargo, las raíces pilosas de *A. halleri* no crecieron de manera adecuada (poca biomasa y con un color café, loque indica raíces muertas) en cambio las raíces pilosas de la especie no hiperacumuladora, *A. thaliana* crecieron según lo esperado un mes después de la inducción (aproximadamente) (**Figura. 8**).

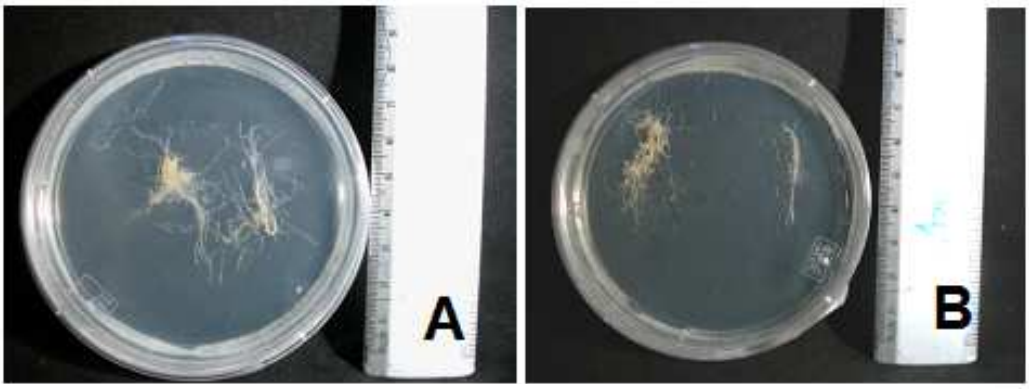


Figura 8. Raíces pilosas de *A. thaliana* (A) y *A. halleri* (B) creciendo en medio sólido un mes después de la infección con *A. rizhogenes*

Las raíces pilosas de *A.halleri* que empezaron a ser propagadas en medio líquido detuvieron su crecimiento (**Figura 9**), incluso en algunos cultivos la bacteria creció de manera significativa, aún cuando el medio de cultivo fue adicionado con el antibiótico cefotaxima. Después de seis meses las raíces pilosas de *A. halleri* no pudieron establecerse en medio líquido con éxito, por lo que no hubo suficiente biomasa para realizar los experimentos planeados.

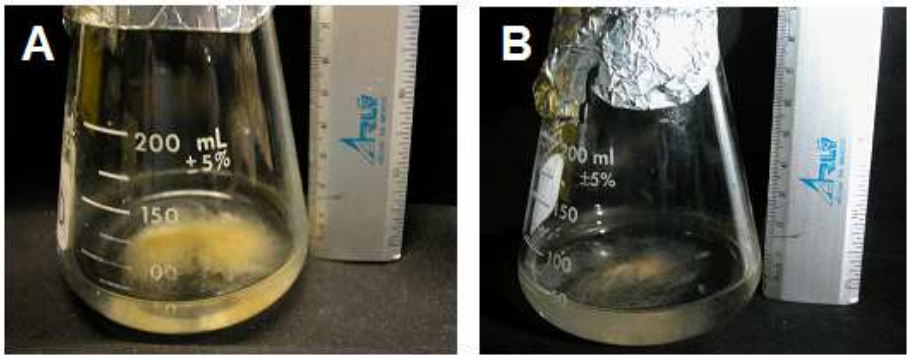


Figura 9. Raíces pilosas de *A. thaliana* (A) y *A. halleri* (B) creciendo en medio sólido un mes después de la inducción con *A. rizhogenes*

Se seleccionaron las raíces pilosas de la especie hiperacumuladora de Ni *A. lesbiacum*, y como control las raíces de *A. montanum* (no hiperacumuladora), entre otras cosas debido a que se habían establecido cultivos de raíces pilosas de ambas especies en un trabajo previo dentro del laboratorio del Dr. Joseph Dubrovsky.

Las raíces pilosas de estas especies fueron propagadas de manera favorable en medio líquido; sin embargo, el crecimiento de las raíces de *A. lesbiacum* fue más lento en comparación con las raíces pilosas de *A. montanum*.

7.4 Comparación del porcentaje de supervivencia del meristemo apical

La concentración de Ni que las raíces pilosas de *A. lesbiacum* y *A. montanun* son capaces de tolerar, se evaluó mediante el análisis de supervivencia del meristemo apical de la raíz usando como fluorocromo al CFDA.

La supervivencia de las raíces en condiciones control fue cercano al 90% para *A. lesbiacum* y para *A. montanum*, (87% y 89% respectivamente). En la **Figura 10** se observa que la supervivencia de las raíces de *A. lesbiacum* (excepto en 0.9 mM) y de *A. montanum* disminuye significativamente con

respecto a las raíces que no estuvieron expuestas al metal (p<0.05). Sin embargo, el efecto tóxico es más visible en las raíces de *A. montanum* pues a partir de 0.9 mM de Ni en solución, se registra un porcentaje de supervivencia de 58% y las raíces expuestas a la concentración de 3.6 mM presentan un porcentaje de supervivencia por debajo del 50 % en comparación con las raíces de *A. lesbiacum* que presentaron un porcentaje de 74% (p<0.001).

Estos resultados sugieren que *A. lesbiacum* tolera concentraciones más altas de Ni en comparación con *A. montanum*.

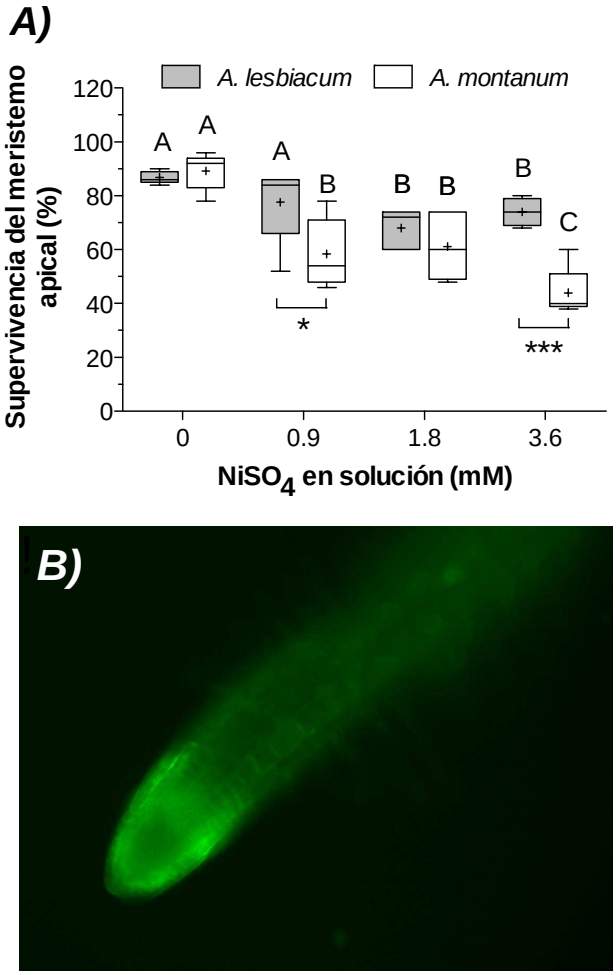


Figura 10. Porcentaje de supervivencia del meristemo apical de la raíz después del período de aclimatación y 24 horas de exposición al $NiSO_4$ (n=50 raíces para cada réplica, 5 réplicas, panel *A*), imagen representativa de un meristemo apical de *A. montanum* después de la exposición al fluorocromo CFDA (Aumento 20*x*, panel *B*). Para comparar los porcentajes de supervivencia entre los tratamientos se realizó un ANOVA de dos vías (factores tratamiento y especie) seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. [a,b,c] literales distintas para cada especie indican diferencias significativas entre los tratamientos (p<0.05). Dentro de cada tratamiento las cajas unidas con corchete invertido indican diferencias significativas entre las especies ([*] y [***], p<0.05 y 0.001, respectivamente).

7.5 Variaciones en el pH de la solución

El pH es uno de los factores que más influyen en la capacidad de acumulación de metales, por lo tanto en este trabajo se determinó el valor de pH de la solución de Ni antes y después de exponer las raíces pilosas (vivas y muertas) al metal, con el fin de conocer si las diferentes concentraciones de Ni, así como el periodo de incubación, tienen algún efecto en el pH de la solución. El valor promedio de pH de la solución con Ni al inicio del experimento fue de 6.07.

En la **Figura 11A**, observamos que el pH de la solución donde se mantuvieron las raíces pilosas de *A. lesbiacum*, disminuye durante las primeras horas de exposición, pero a partir de las 6 horas aumenta hasta 7.26 indicando que existe una correlación positiva entre el valor del pH de la solución de Ni y el tiempo de exposición ($p<0.05$), excepto en lasolución con 3.6 mM de Ni donde el pH disminuyó hasta 5.11 y fue a partir de las 24 horas de exposición que el pH se incrementó (pH=5.6) sin diferencias significativas con respecto a los otros tiempos de exposición ($p>0.05$).

Por el contrario, el pH de la solución donde fueron incubadas las raíces de *A. montanum*, presenta grandes variaciones, no habiendo correlación entre el tiempo de exposición y el valor de pH ($p>0.05$). En todos los tratamientos el pH se mantuvo por debajo del valor inicial (6.07).

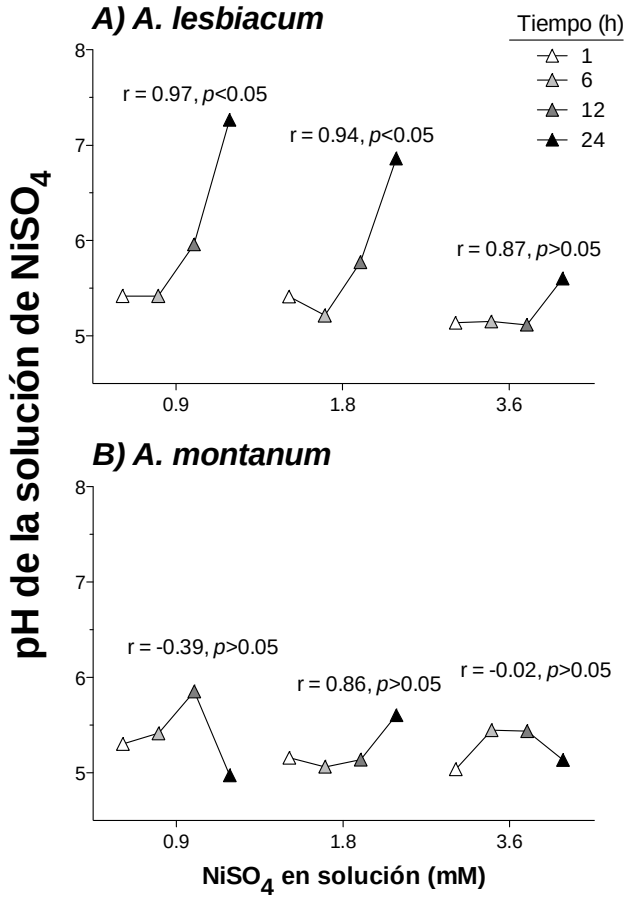


Figura 11. Variación de pH de la solución de $NiSO_4$ conteniendo cultivos de raíces pilosas de *A. lesbiacum* (panel *A*) y *A. monatnum* (panel *B*) después de 1, 6, 12 y 24 horas. La comparación del efecto del tiempo sobre el valor de pH se realizó mediante un análisis de correlación lineal de Pearson (n= 5).

Con el fin de conocer la capacidad de adsorción de las raíces pilosas de la especie hiperacumuladora como de la no acumuladora se procedió a exponer a las raíces pilosas de ambas especies previamente secas a diferentes concentraciones de Ni en diferentes tiempos. Cuando la biomasa muerta fue expuesta a la solución con Ni tanto de *A. lesbiacum* como de *A. montanum* el pH de la solución disminuyó con respecto al de la solución al inicio de los experimentos (5.57) alcanzando valores de pH por debajo de 5 en todos los casos. Estos datos indican que no existe una correlación entre el tiempo de exposición y el pH de la solución en casi todos los tratamientos ($p>0.05$) excepto en el caso de las raíces de *A. lesbiacum* expuestas a 1.8 mM ($p<0.05$) (**Figura 12**).

Los resultados sugieren que las raíces vivas de *A. lesbiacum* son capaces de regular el pH de la solución donde fueron incubadas a través del tiempo; en cambio, las raíces de *A. montanum* y las raíces muertas de ambas especies son incapaces de hacerlo.

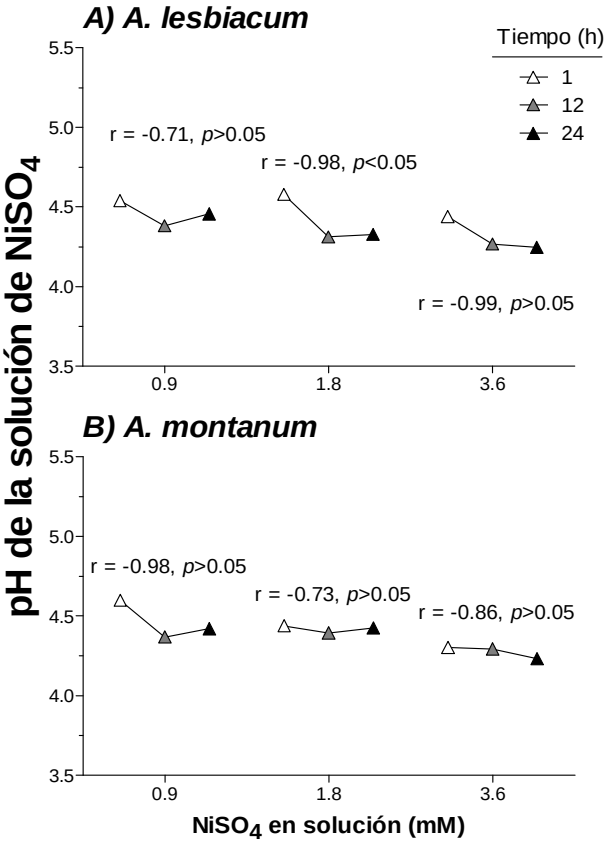


Figura 12. Variación del pH de la solución de $NiSO_4$ conteniendo cultivos de raíces pilosas muertas de *A. lesbiacum* (*A*) y *A. monatnum* (*B*) después de 1, 12 y 24 h. La comparación del efecto del tiempo sobre el valor de pH se realizó mediante un análisis de correlación lineal de Pearson (*n*=5).

7.6 Acumulación de níquel en las raíces pilosas de *A. montanum* y *A. lesbiacum*

La concentración de Ni en la biomasa aumenta al incrementar la concentración del metal en la solución al igual que al aumentar el tiempo de exposición. En la **figura 13A** observamos que las raíces de *A. lesbiacum* presentan mayor acumulación a las 24 horas en 3.6 mM de Ni (3 890 mg kg^{-1}peso seco).

Sin embargo, la concentración más alta de Ni se observa a las 12 horas de exposición, en raíces de *A. montanum* (4 256 mg kg^{-1}) en 3.6 mM de Ni (**Figura 13B**). Pero la acumulación de las raíces pilosas de esta especie disminuyó cuando estuvieron expuestas por 24 horas independientemente de la concentración de Ni. La concentración mínima adsorbida por estas raíces fue de 478 mg kg^{-1} en un periodo de exposición de una hora en 0.9 mM de Ni.

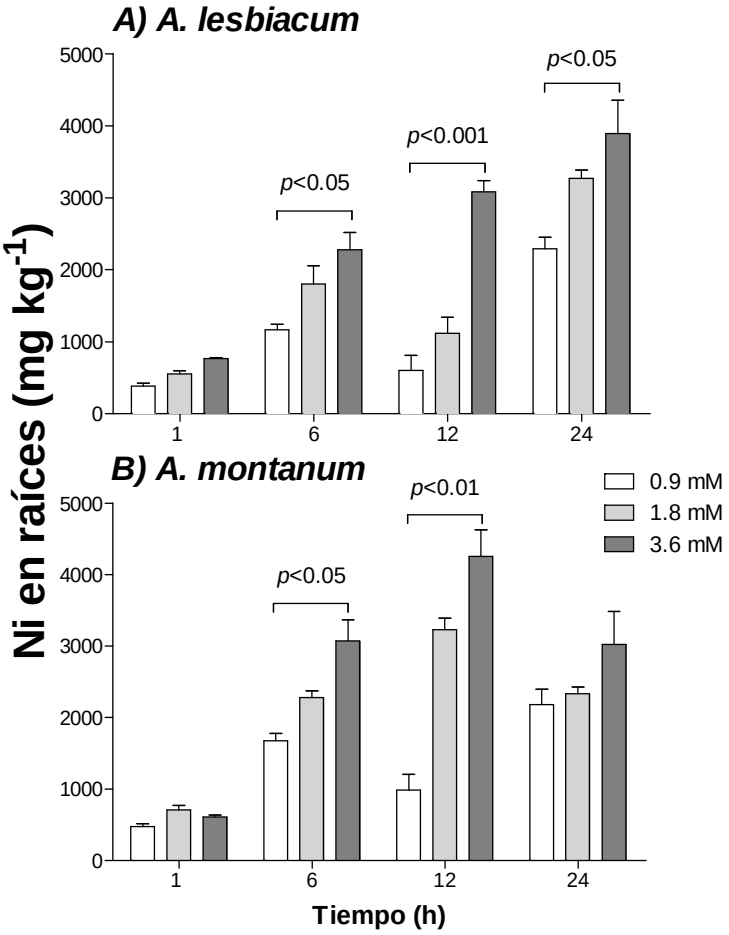


Figura 13. La acumulación de Ni en cultivos de raíces pilosas vivas de *A. lesbiacum* (panel *A*) y *A. montanum* (panel *B*) después de una exposición de 1, 6, 12 y 24 h a las concentraciones de 0.9, 1.8 y 3.6 mM de $NiSO_4$. Para comparar la cantidad de Ni en la biomasa vegetal se realizó un ANOVA de dos vías (factores concentración y tiempo de exposición) seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Dentro de cada tiempo de exposición los corchetes invertidos indican diferencias significativas entre todas concentraciones

En la **Figura 14**, se observa la relación entre el CB con respecto al tiempo. Para ambas especies este valor aumenta al paso del tiempo para cada concentración analizada, se presenta un valor mínimo de 4 después de una hora de exposición en 3.6 mM de Ni y un máximo de 43 después de 24 horas en 0.9 mM,

lo que indica que el coeficiente de bioacumulación depende del periodo de exposición (R^2= 0.83, 0.82 y 0.82 para 0.9, 1.8 y 3.6 mM, respectivamente, $p<0.01$) sólo en el caso de *A. lesbiacum*. En cambio, para *A. montanum* la variación de los valores del coeficiente de bioacumulación es tal, que no podemos decir que exista una relación con respecto al tiempo, para esta especie se registró un valor máximo de 41 (24 hrs en 0.9 mM de Ni) y un mínimo de 3 (1 h en 3.6 mM de Ni). Estos datos sugieren que la capacidad de acumulación será mayor cuanto más prolongado sea el tiempo de exposición sólo en el caso de la especie hiperacumuladora *A. lesbiacum.*

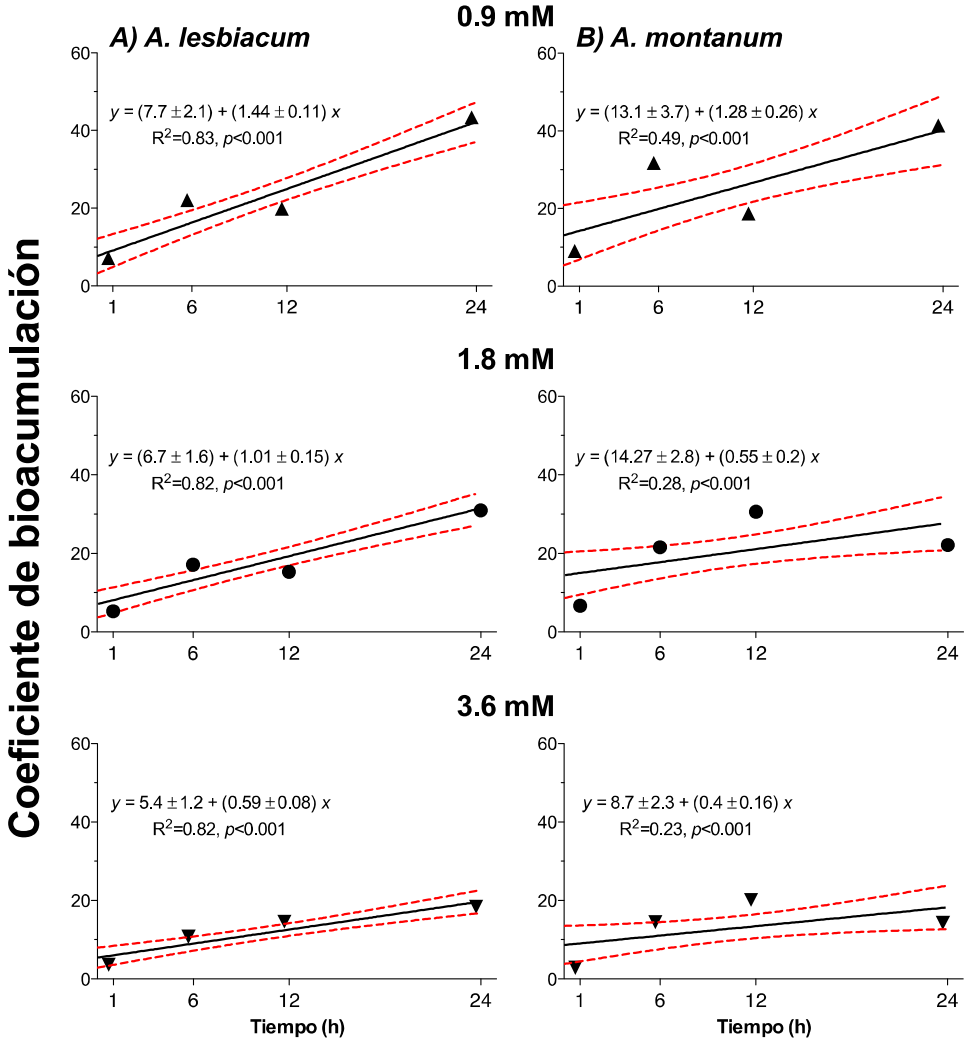


Figura 14. Análisis de regresión lineal entre el tiempo de exposición y el coeficiente de bioacumulación (cantidad de metal en la raíz/cantidad inicial de metal en la solución) de Ni en raíces pilosas vivas de *A. lesbiacum* (panel *A*) y *A. montanum* (panel *B*) frente a concentraciones de 0.9 (panel superior), 1.8 (panel intermedio) y 3.6 mM de $NisO_4$ (panel inferior). Los puntos representan el promedio de las observaciones a cada tiempo (n=5) y la línea recta y punteada, el ajuste lineal e intervalos de confianza al 95%, respectivamente. El inserto presenta la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación.

7.7 Bioadsorción de níquel en las raíces pilosas de *A. montanum* y *A. lesbiacum*

Con el fin de conocer la participación de la pared celular en la acumulación de Ni en las raíces pilosas de *A. lesbiacum* Se avaluó la concentración de Ni adsorbida por las raíces pilosas muertas y se observó que ésta aumenta a través del periodo de exposición y con la concentración de Ni en la solución. La biomasa muerta de esta especie adsorbió una mayor cantidad de Ni (10 239.7 mg kg^{-1}) cuando es expuesta a 3.6 mM de Ni durante 24 horas y la concentración mínima (3 415.6 mg kg-1) se presenta a una hora en 0.9 mM de Ni (**Figura 15A**).

En la **Figura 15B** observamos que la concentración de Ni adsorbida por las raíces de *A. montanum* aumenta significativamente ($p<0.001$) al incrementar la concentración del metal en la solución. La mayor concentración de Ni (9 820.3 $mgkg^{-1}$, con un porcentaje de recuperación de 94) se registró en raíces expuestas a 3.6 mM de Ni en solución a 12 horas.

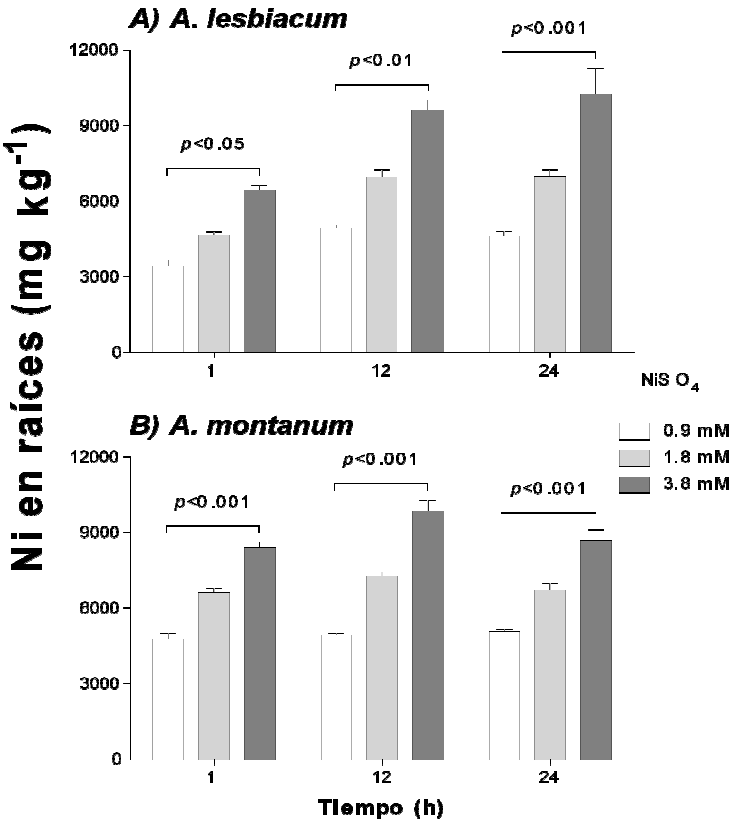


Fig. 15. La adsorción de Ni en cultivos de raíces pilosas muertas de *A. lesbiacum* (panel *A*) y *A. montanum* (panel *B*) después de una exposición de 1, 12 y 24 h a las concentraciones de 0.9, 1.8 y 3.6 mM de $NiSO_4$. Para comparar la cantidad de Ni en la biomasa vegetal se realizó un ANOVA de dos vías (factores concentración y tiempo de exposición) seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Dentro de cada tiempo de exposición los corchetes invertidos indican diferencias significativas entre las concentraciones (n=5).

7.8 Comparación de acumulación de Ni en los bioensayos de bioacumulación (raíces vivas) y bioadsorción (raíces muertas)

En la **Figura 16** se compara la concentración de Ni en la biomasa de raíces muertas y raíces vivas de *A. lesbiacum* y *A. montanum* en cada uno de los tratamientos. Es posible observar que las raíces de *A. lesbiacum* tienen una mayor concentración del Ni al aumentar la concentración de este metal en la solución a través del tiempo, aparentemente sin llegar a la saturación. Sin embargo, la biomasa muerta de esta especie tiene una mayor cantidad del metal 2.6 veces (10 240 $mgkg^{-1}$) más en comparación con las raíces vivas (3 890 $mgkg^{-1}$) a 3.6 mM durante 24 horas respectivamente.

En cambio las raíces pilosas de *A. montanum* presentan el comportamiento opuesto, la concentración del metal en raíces tanto vivas como muertas decae después de 12 horas de exposición. La biomasa seca también tiene una mayor concentración de Ni (9 820 $mgkg^{-1}$) con respecto a las raíces vivas (3 072 $mgkg^{-1}$) después de 12 horas de exposición a 3.6 mM de Ni en solución.

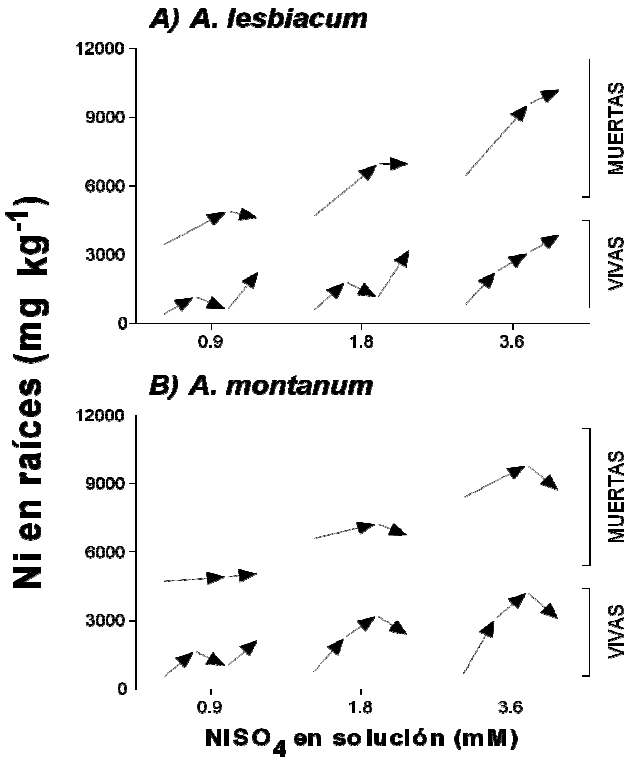


Figura 16. Comparación de la concentración de Ni en raíces vivas y muertas de *A. lesbiacum* (*A*) y *A. montanum* (*B*) después de 1, 6, 12 y 24 h. Las flechas indican el tiempo de exposición a cada concentración de Ni.

8. DISCUSIÓN

8.1 Inducción y establecimiento de cultivos de raíces pilosas de *A. halleri* y *A. thaliana*

Las raíces pilosas son ampliamente utilizadas en la producción industrial de metabolitos secundarios debido principalmente a que presentan crecimiento rápido sin la adición de hormonas (revisado en Giri y Narasu, 2000), sin embargo durante el desarrollo de esta tesis fue muy complicado el propagar con éxito los cultivos de las raíces pilosas de *A. halleri*, a pesar de que en un trabajo anterior (Sánchez, I., 2008) no se presentaron problemas, incluso se obtuvo una velocidad relativa de crecimiento (VRC) de 8% en condiciones control.

En este trabajo se utilizó el mismo método de transformación usado en 2008, sin embargo las raíces que emergieron a partir de las incisiones en hojas y peciolos de *A. halleri*, no crecieron lo suficiente como para obtener la biomasa necesaria para el análisis de PCR y confirmar la naturaleza transgénica de las raíces. Al cambiar el método de transformación usando plantas completas, las raíces que emergieron a partir de los sitios de infección crecieron adecuadamente. Se obtuvo el tejido necesario para el análisis de PCR y se confirmó que las raíces de *A. halleri* y *A. thaliana* (especie no acumuladora) fueron transformadas con *A. rizhogenes* (**Figura 7**). A pesar de su naturaleza transgénica, el crecimiento de las raíces pilosas de *A. halleri* fue muy lento con respecto a las raíces pilosas de *A. thaliana* que crecieron conforme a lo esperado. Dado que *A. thaliana* se transformó y respondió de manera óptima no podemos atribuir el lento crecimiento de las raíces pilosas de *A. halleri* al evento de transformación. Las semillas de esta especie fueron almacenadas por largo tiempo a -20°C y se observó (cualitativamente) que las semillas de *A. halleri* disminuyeron su viabilidad. Por lo tanto, es posible que el tiempo de almacenaje ocasionara algunos cambios fisiológicos que impidieron el crecimiento normal de las raíces pilosas. Otro factor que pudo haber influido en el crecimiento de las raíces pilosas de *A. halleri* fue la temperatura ambiental. Durante primavera y verano la temperatura fue muy alta, superando frecuentemente los 30 °C, fue en estas estaciones cuando se comenzó la propagación de los cultivos en medio líquido y aun cuando los cultivos se mantuvieron en cuartos de cultivo bajo temperaturas controladas fue difícil mantener en éstos una temperatura constante de 21 °C.

8.2 Efecto del Ni en las raíces pilosas de *A. lesbiacum* y *A. montanum*

Al no poder establecer con éxito los cultivos de raíces pilosas de *A. halleri* el trabajo se continuó sólo con las especies*A. lesbiacum* y *A. montanum*. Para conocer la concentración máxima de Ni que las raíces pilosas de estas dos especies son capaces de tolerar, se estimó el porcentaje de supervivencia del meristemo apical de las raíces pilosas y se encontró que bajo condiciones control (sin el metal) el porcentaje es cercano a 90 %.Consideramos que los cultivos no presentan un porcentaje mayor debido a que se estimó sólo la supervivencia de los meristemos de las raíces, la zona más sensible a daño mecánico, y no se consideró la supervivencia de los primordios que se encuentran en la parte sub-apical y que dan origen a nuevas raíces laterales. También se debe tener en cuenta que el periodo de aclimatación que significó la reducción de nutrientes minerales y sacarosa, podría ser un factor negativo en la supervivencia de estas raíces. Cuando las raíces pilosas fueron expuestas a concentraciones más altas de Ni se observó que la supervivencia disminuye al aumentar la concentración de este metal en la solución de cultivo, tanto en *A. lesbiacum* como en *A. montanum*, sin embargo el efecto tóxico del Ni es más fuerte en las raíces de la especie no acumuladora, reduciendo el porcentaje de supervivencia de las raíces pilosas hasta 40 % cuando éstas fueron expuestas a 3.6 mM de Ni. Se sabe que *A. lesbiacum* tiene diferentes mecanismos de defensa que le permiten evitar el efecto tóxico del Ni, por ejemplo concentraciones altas de histidina libre en el xilema del tallo y de la raíz. Este aminoácido aumenta durante la exposición de la planta al Ni y funciona como un agente quelante de iones del metal, también se observó que la adición de histidina al medio de cultivo resulta en una mayor acumulación de Ni e histidina en el xilema de la planta no acumuladora *A. montanum* (Krämer *et al.* 1996). Es posible entonces atribuir la gran tolerancia de *A. lesbiacum* al Ni a este tipo de procesos fisiológicos que son exclusivos de plantas hiperacumuldoras de metales.

Existen numerosos trabajos que reportan la importancia del valor de pH en la biodisponibilidad de los metales en la solución del suelo y por ende en la bioacumulación de metales por las plantas (Chuang*et al*., 1996; Kukier et al. 2004; Rooney*et al*. 2007). También lo es el pH de la solución nutritiva, pues influye en la solubilidad, especiación y toxicidad de metales traza, por ejemplo, se ha reportado que a partir de un pH cercano a 6 disminuye la solubilidad del Ni como ion libre y que la solubilidad del $NiSO_4$ es aún menor (Kopittke, *et al*. 2010). Se sabe que las raíces de las plantas incrementan la biodisponibilidad de los metales al liberar protones acidificando la solución del suelo. Es por eso que en este trabajo se determinaron los cambios en el pH provocados por la exposición de las raíces pilosas de *A. lesbiacum* y *A. montanum*, en la solución de cultivo con concentraciones altas de Ni. Para ninguno de

los ensayos realizados en este trabajo se ajustó el pH de la solución de Ni, con el fin de observar las variaciones en el pH. Es importante recordar que se usó agua desionizda con 0.01x de medio Hoagland para simular la concentración de sales presentes en el agua de la llave.No se llevaron a cabo experimentos con agua de sitios contaminados debido a su contenido alto de materia orgánica que probablemente interferiría con la disponibilidad del metal a ser absorbido por la planta (Karlik y Szpakowska, 2001).Se registró un valor promedio de pH inicial cercano a 6 sin importar la concentración de Ni en solución y se observó que al exponer las raíces vivas de *A. lesbiacum* al metal,el pH disminuye en las primeras 6 horas de cultivo, pero el pH aumenta de 6.0 hasta 7.26 o 6.86 (0.9 y 1.8 mM, respectivamente) indicando que existe una correlación entre el pH y el periodo de exposición. Resultados similares fueron reportados por Bernal y McGrath (1994). Ellos encontraron que las raíces de *A. murale* reducen su capacidad de liberar protones al aumentar la concentración de metales en el medio de cultivo con un pH 7 o cuando éste disminuye (Bernal y McGrath, 1994). Se observó que cuando las raíces pilosas de *A. lesbiacum* fueron expuestas a la concentración más alta (3.6mM), el pH disminuyó hasta 5.11 y no se incrementó con el paso del tiempo. El pH de la solución donde fueron expuestas las raíces de *A. montanum* se mantuvo por debajo de 6, en cualquier tratamiento. El Ni es un elemento esencial para el metabolismo de las plantas (Prieto *et al.* 2009) sin embargo, el medio de cultivo, en el que se propagaron las raíces pilosas de ambas especies antes de los experimentos con exceso de Ni, no tenía el metal como parte de su composición.Posteriormente se retiró la fuente de carbono y los minerales esenciales. Es posible que las raíces pilosas de *A. lesbiacum* y de *A. montanum* como respuesta a la necesidad de "captura" de níquel comenzaran a liberar protones con el fin de obtener los minerales necesarios para su desarrollo, probablemente con el paso del tiempo las raíces pilosas de *A .lesbiacum,* al no necesitar mayores concentraciones de Ni, dejaron de liberar protones al medio. Se propone este escenario como una posible explicación ya que se ha visto que algunas plantas exudan carboxilatos con el fin de remover los nutrientes minerales de las partículas del suelo (Rascio y Navari-Izzo, 2011; Clemens, 2002). Es probable que por esta razón se haya observado un decremento en el pH, sin embargo, cuando las raíces pilosas de esta especie estuvieron expuestas a 3.6 mM de Ni, el pH se mantuvo por debajo de 6 sin importar el periodo de incubación; tal vez el efecto tóxico del Ni a estas concentraciones no permitió la respuesta común de esta especie hiperacumuladora. Resultados similares se observaron en la solución donde se incubaron las raíces pilosas de *A. Montanum*; en este caso el pH fue menor a 6.

En este trabajo también se evalúo la capacidad de adsorción de la biomasa muerta de las raíces pilosas de *A. lesbiacum* y de *A. montanum* y también registramos las variaciones en el pH en la solución de incubación al exponer las raíces pilosas secas a concentraciones altas de Ni. Encontramos que el pH disminuye manteniéndose por debajo de 5 (**Figura 12**), sin importar la especie, la concentración, o el tiempo de exposición al Ni. Es posible que estos resultados sean consecuencia de la composición de la pared celular. La pared celular de las plantas está constituida en su mayoría por agua y una fracción sólida de polisacáridos (pectinas, hemicelulosa y celulosa) y glicoproteínas (extensinas y arabinogalactanos, Fray, 2001). Estas macromoléculas tienen numerosos grupos funcionales hidroxil, carboxil o fosfatos que pueden actuar como ligandos para el Ni (Ahluwalia, *et al*. 2007). Al someter a las raíces a un proceso de secado es posible que la composición de la pared celular de las raíces se modifique (Kapoor y Virararaghavan, 1998), provocando que algunos grupos funcionales con pH ácido queden libres en la solución de Ni.

8.3 Biocumulación de Ni en las raíces de *A. lesbiacum* y *A. montanum*

En este trabajo se comprueba que las raíces pilosas de *A. lesbiacum* son hiperacumuladoras de Ni aún sin la parte aérea y sin suplementos nutritivos en condiciones no estériles y a corto plazo (máximo 24 horas). Se ha reportado esta capacidad de acumulación también en raíces pilosas de *Calystegia sepium.* Tepfer *y* colaboradores (1989) reportaron que las raíces pilosas de esta especiesobreviven en condiciones no estériles en lodos residuales por largos periodos y que pueden ser puestas directamente en el suelo donde detienen su crecimiento pero mantienen su actividad metabólica (Tepfer, *et al*. 1989). En esta tesis, se evaluó la relación del periodo de exposición con respecto al tiempo, ya que con fines de fitorremediación se pretende que en el menor tiempo posible se recupere la mayor cantidad de metal para evitar efectos de la calidad del agua sobre la capacidad de acumulación de las raíces pilosas. Se ha reportado que las raíces pilosas de otra Brassicaceae hiperacumuladora de metales, *Thlaspi caerulescens,* alcanzan la saturación en la acumulación en tan solo 30 minutos (Nedelkoska y Doran 2000); estos resultados son muy atractivos cuando hablamos de remediación de efluentes industriales.

Se encontro que la concentración de Ni en las raíces pilosas de *A. lesbiacum* aumenta con el periodo de exposición y con el incremento de Ni en el medio, observando un máximo de Ni acumulado en las raíces de 3 890 mg kg^{-1}(peso seco) a las 24 horas de exposición en 3.6 mM de Ni (**Figura 12**), la concentración de Ni en la biomasa bajo cualquier tratamiento se encuentra por encima de la cifra

aceptada para poder considerar a una especie vegetal como hiperacumuladora de Ni (1 000 mg kg^{-1}) (Brooks *et al*., 1979). Sin embargo, en un trabajo previo dentro de nuestro laboratorio se observó que raíces pilosas de esta especie acumularon 8 540 mg kg^{-1} en el mismo periodo pero con dos veces menos Ni en solución (De Jesús G, 2011). Aunque comparado con lo reportado por Nedelkoska y Doran (2000). Ellos evaluaron la concentración de Ni en raíces pilosas de tresespecies del género *Alyssum* expuestas 9 horas a 20 ppm de Ni y encontraron que para ninguna de las tres se rebasan los 2 000 mg kg^{-1}. En comparación con experimentos realizados con plantas completas no transformadas de *A. lesbiacum* la mayor concentración de Ni es acumulada en la parte aérea, se han registrado valores superiores a los 30 000 $mgkg^{-1}$ pesos seco y en raíces una concentración máxima de Ni de 11 220 mg kg^{-1} (De Jesús G, 2011). Se sabe que esta especie compartamentaliza el Ni principalmente en la vacuola de las células epidémicas de hoja y tallo (Küper et al., 2001), también se ha demostrado que la mayor parte del Zn acumulado por plantas de *T. caerulescens* es almacenado en la parte aérea (Lasat et al., 1998). Estos datos sugieren que la mayor parte del Zn o Ni es translocado a la parte aérea donde es compartamentalizado para atenuar el efecto tóxico de concentraciones altas de metales en la planta. Se sugiere que las bajas concentraciones de Ni registradas en las raíces pilosas de *A. lesbiacum* en este trabajo son consecuencia posiblemente de este mecanismo de tolerancia a metales. Se debe considerar también que las condiciones experimentales a las que se sometieron las raíces, fueron bastante estresantes, ya que se les suspendió la fuente de carbono y minerales por un periodo mínimo de 37 horas y un periodo máximo de 60 h. Otros factores importantes que posiblemente limitarían la capacidad de acumulación de las raíces pilosas de *A. lesbiacum*se caracterizan por crecer en aglomerados y por esta razón el centrodel cultivo queda con una baja disponibilidad de nutrientes y oxígeno; además, la aereación mecánica ocasiona daños en la pared celular lo que las hace más sensibles (revisado en Giri y Narasu, 2000).

De manera sorpresiva encontramos queen periodos cortos las raíces vivas de la especie no acumuladora *A. montanum* almacenan concentraciones altas de Ni incluso de manera similar a la especie hiperacumuladora; estos resultados son recurrentes. Nedelkoska y Doran (2001) registraron que las raíces pilosas de *N. tabacum* acumularon cantidades similares de Ni con respecto a las raíces de las especies hiperacumuladoras de Ni *A. bertolonii* y *A. tenium*. El trabajo realizado por Lasat y colaboradores (1998) demuestra que existe una mayor cantidad de Zn en las raíces de plantas completas de *T. arvense* (especie no acumuladora) con respecto a las raíces de *T. caerulescens,* pues en esta última la mayor parte del metal se encuentra en las hojas y en el tallo. Estos autores sugieren que se trata

de una estrategia de *T. arvense* para evitar que el Zn sea transportado al xilema y subsecuentemente se transloque a la parte aérea, siendo así una especie exclusora. Se puede suponer que *A. montanum* también es una especie exclusora de metales, mecanismo de defensa para evitar que los metales en exceso sean transportados a la parte aérea y que un mecanismo similar sucede en las raíces pilosas.

Aunque *A. montanum* puede acumular grandes cantidades de Ni, se observó que la acumulación del metal disminuye a concentraciones demasiado altas (3.6 mM), estos datos son consistentes con los porcentajes de supervivencia, cuando las raíces están expuestas a 3.6 mM de Ni la supervivencia disminuye considerablemente (<50%) y la acumulación del metal también disminuye, debido al efecto tóxico del metal, indicando que esta especie no cuenta con los mecanismos necesarios para detoxificar al metal.

A pesar de que la cantidad de metal presente en la biomasa de las especies estudiadas ayuda a determinar la acumulación del metal en el tejido, es el coeficiente de bioacumulación CB (definido como la concentración de metal en el tejido vegetal/concentración de metal en el medio al inicio del cultivo) el que permite determinar la capacidad de extracción de metales de una especie vegetal. Este valor debe ser mayor a 1 para considerar a una especie acumuladora de metales (revisado en Zaho *et al.* 2003). En este trabajo se encontró que el CB es mayor a 1 en cualquier tratamiento para las raíces de ambas especies, de hecho no existen diferencias significativas entre la especie hiperacumuladora y no acumuladora. Para *A. lesbiacum* se reportó que el CB incrementa con respecto al tiempo de exposición a diferencia de lo que se observa para *A. montanum* donde no hay relación con el tiempo. Las raíces pilosas de *A. lesbiacum* presentan un CB máximo de 43 (exposición a 3.6 mM por 24 horas). Este resultado es mucho menor a lo esperado, se ha reportado un CB máximo de 162 en un medio con 0.9 mM de Ni durante el mismo tiempo de exposición, pero en condiciones de cultivo con sacarosa y minerales. Incluso otras especies tienen un potencial de extracción mayor. Dushenkov y colaboradores (1995) determinaron que las raíces pilosas de *Brassica juncea* presentan un CB de 208 expuestas a 10 mg/L de Ni por 24 horas. Los resultados reportados corresponden a experimentos realizados con raíces pilosas creciendo en solución suplementada con nutrientes y una fuente de sacarosa abundante. Como se mencionóanteriormente es posible que el estrés causado por la falta de elementos esenciales haya causado una disminución en la capacidad de hiperacumulación de *A. lesbiacum*. El hecho de que la presencia de sacarosa en el medio de cultivo aumente la capacidad de tomar el metal, sugiere que la sacarosa permite la generación de energía y mantenimiento de otros procesos metabólicos que intervienen en el transporte y detoxificación del metal (Al-Asheh y Duvnjak, 1995).

8.4 Bioadsorción de Ni de las raíces pilosas de *A. lesbiacum* y *A. montanum*

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la capacidad de acumulación de las raíces pilosas de *A. lesbiacum* para su uso como filtros biológicos de aguas contaminadas y teniendo en cuenta que estas aguas además de Ni presentan otro tipo de contaminantes como agentes biológicos (bacterias, hongos, parásitos, etc.), otros metales (cadmio, plomo, zinc etc.) y contaminantes orgánicos (hidrocarburos) que podrían influir negativamente en la capacidad de acumulación de *A. lesbiacum*. Se decidió evaluar la capacidad de adsorción de la biomasa seca proveniente de raíces pilosas. Esta condición presenta una gran ventaja ya que las raíces muertas pueden ser expuestas a condiciones extremas (tales como las encontradas en aguas residuales) sin preocuparse del efecto de éstas en la capacidad de acumulación. Existe un gran número de trabajos que refieren el uso de biomasa seca derivada de plantas como bagazo, cáscara de frutos, paja de trigo, cáscara de frutos etc, aunque el uso de este tipo de productos de desecho de la industria de jugos hace necesario remover algunos compuestos como azúcares o colorantes antes de exponer la biomasa al metal (revisado en Ahluwalia, *et al*., 1998). En este trabajo se encontró que la concentración de Ni adsorbida en las raíces pilosas secas de *A. lesbiacum* depende del tiempo de exposición y de la concentración del metal en el medio, esto se entiende porque habiendo más Ni en el medio será más fácil que los sitios de intercambio cationico sean ocupados por el metal. La concentración máxima adsorbida fue 10 238 mg kg^{-1} (raíces expuesta a 3.6 mM de Ni durante 24 horas) (**Figura 18A**), es decir 2.5 veces más que las raíces vivas en las mismas condiciones. Se obtuvieron resultados similares para las raíces muertas de *A. montanum*, posiblemente este resultado se deba a una estrategia de la especie no acumuladora al presentar ciertos grupos fincionales en la pared celular, es decir que el metal se precipite en las paredes celulares de la raíz y así evitar que entre a la célula.

Aunque la concentración de Ni adsorbida por las raíces de *A. lesbiacum* o *A. montanum* no es tan alta como lo reportado para otras especies, entre otras cosas, probalemente debido a que no se aprovechó toda la superficie de adsorción de las raíces pues las raíces no se molieron. También es posible aumentar la capacidad de adsorción de las raíces pilosas de *A. lesbiacum* a través de métodos de "pretratamiento" que hacen que los sitios de adsorción en la superficie celular, aumenten, cambien su estado químico la accesibilidad o aumenten su afinidad; también se sabe que el tratamiento que se le da a la biomasa para matarla influye en su capacidad de acumulación (Alluri, *et al*., 2007). Probablemente si se optimizan las condiciones de pH, así como el pretratamiento de de las raíces, se obtendrá mayor cantidad de metal adsorbido. También es necesario hacer experimentos donde las concentraciones de Ni en solución no sean tan altas.También es preciso hacer experimentos con agua proveniente de alguna

planta de tratamiento para evaluar el efecto de otros contaminantes sobre la capacidad de adsorción de las raíces y así estar más cerca cada vez más a las condiciones reales de fitorremediación, pues se debe tener en cuenta que durante este experimento se usó una solución de medio Hoagland al 0.01x con el fin de simular las concentraciones de sales en el agua potable. Sin embargo, las aguas contaminadas tienen grandes contenidos de materia orgánica y podrían competir por el metal con los sitios de adsorción de la pared celular de las raíces de *A. lesbiacum,* lo cual depende de la afinidad de las partículas por esos sitios.

Los resultados presentados en este trabajo al evaluar la capacidad de bioacumulación de Ni por las raíces pilosas de *A. lesbiacum* bajo condiciones no estériles y sin el suplemento de minerales y sacarosa influyen drásticamente en su capacidad hiperacumuladora de Ni. Además, se observó que esta capacidad aumenta con el tiempo de exposición. Estos fenómenos representan una gran limitante para nuestro objetivo de usar raíces vivas como filtros biológicos. Por otro ladoencontramos que la capacidad de adsorción de la biomasa seca de *A. lesbiacum* e incluso de *A. montanum* es alta y presenta varías ventajas sobre el uso de raíces pilosas vivas: 1) Es posible mantener a las raíces filtrando el agua por un mayor periodo obteniendo así una mayor adsorción sin que los factores de temperatura o acidez afecten el metabolismo de la planta, 2) la disminución de costos, pues la producción en masa con fines de fitorremediación implica muchos factores a considerar que elevarían el costo del proceso; por ejemplo, es necesario mantener una temperatura determinada o una buena oxigenación, la concentración de nutrientes, etc (revisado en Giri y Narasu, 2000), considerando que el cuerpo de agua a ser remediado no contiene los requerimientos adecuados para mantener el cultivo de raíces pilosas de la especie hiperacumuladora, además de que obviamente no se cuenta con condiciones de asepsia indispensables en este tipo de cultivos se hace más atractivo el uso de la biomasa muerta como bioadsorbente, 3) el reciclaje de las raíces muertas de *A. lesbiacum* y al desorber los metales para su posible recuperación (Alluri *et al*., 2007), por lo que se propone como alternativa el uso de la raíces pilosas secas con el fin de utilizarlos como filtros biológicos de aguas contaminadas.

9. CONCLUSIONES

- El crecimiento de las raíces pilosas de *A. halleri* se ve afectado por las condiciones ambientales.
- Las raíces pilosas de *A. lesbiacum* son capaces de tolerar altas concentraciones de Ni
- Las raíces pilosas de *A. lesbiacum* son capaces de hiperacumular Ni en sus tejidos independientemente de la parte aérea en condiciones no estériles.
- La capacidad de bioacumulación de metales de *A. lesbiacum* se ve significativamente disminuida cuando están expuestas en un medio sin una fuente de carbono y compuestos minerales.
- Las biomasa muerta de *A. lesbiacum* es capaz de adsorber grandes cantidades de Ni, incluso más que las raíces pilosas vivas, por lo que proponemos como alternativa el uso de la raíces pilosas secas con el fin de utilizarlos como filtros biológicos de aguas contaminadas.
- Las raíces pilosas de *A. montanum* acumulan grandes cantidades de Ni, debido a que se trata de una especie exclusora.

10. APÉNDICE

Apéndice I.- Medio YM pH 7

-Manitol 1%
-$MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.8 mM
-$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$. 2.2 mM
-Extracto de levadura 0.04%
-NaCl 1.7 mM

Apéndice II. CTAB 2X

-Tris 100 mM HCl, pH 8.0
-EDTA, 20 mM
-NaCl, 1.4 M
-CTAB, 2%

Apéndice III.- Amortiguador TBE 10X

Protocolo para la preparación de 1l del amortiguador TBE 10X
-Pesar 108 g de Tris y 55gr de ácido bórico y disolver en 900 ml de agua
-Añadir 40 ml de EDTA, 0.5M
-Aforar a 1L con agua
-Ajustar el pH a 8.0

Apéndice IV. Condiciones de rampeo del horno de microondas utilizadas durante la digestión de las raíces pilosas

Etapa	Potencia	W %	Tiempo (min)	PSI	C°	Mantenimiento (min)
1	1200 W	100	10:00	0300	150	00:00
2	1200 W	100	5:00	0300	175	02:00
3	1200W	100	5:00	0300	185	10:00

11. REFERENCIAS

Al-Asheh, S. y Duvnjak, Z. 1995.Adsorption of cuopper and ch mromium by Aspergillus carbonarius.*Biotechnology Progress*. **11**:638-642.

Adriano, D.C. 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. Springer-Verlag. New York, USA.

Alluri, K. H., Ronda, R. S., Settalluri, S.V., Bondili, S. J., Suryanarayana, V. Venkateshwar, P. 2007. Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal removal. *African Journal of Biotechnology.* **6**: 2924-2931.

Ahluwalia, S. S y Goyal, D. 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology.* **98**:2243–2257

Alloway, Dr, B.J. 1995. Heavy Metals in Soils. Springer. Londres. pp. 384.

Arrivault, S., Sanger, T., Krämer, U. 2006. The Arabidopsis metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. *The Plant Journal*. **46**: 861-879.

ARS, Departamento de Agricultura de los E.U.A. New Crop Can Mine Nickel at a Low Cost [publicación en línea] Disponible en : http://www.ars.usda.gov/is/pr/2002/020109.htm

BV SORBEX, Inc. 2006. Technology Description [publicación en línea]. Disponible en Internet: http://www.bvsorbex.net/sxProcess.pdf [Fecha de acceso: 21 de septiembre de 2011].

Baird, C. 2001. Química Ambiental. Editorial Reverté. España. pp. 651.

Barceló, J. y Poschenrieder, C. 2003. Phytoremediation: principles and perspectives. *Contributions to Science*.**2**: 333-344.

Barceloux, G. D. 1999. Nickel. *Clinical Toxicology*, **37**:239–258.

Benavides, P., Gallego, M. y Tomaro, L. 2005. Cadmium toxicity in plants.*Braz. J.Plant Physiol***17**(1):21-34.

Bernal, M.P., McGrtah, S.P. 1994. Effects of pH and heavy metal concentrations in solution culture on the protonrelease, growth and elemental composition of *Alyssum* murale and *Raphanus sativus L.Plant and Soil* **166***:* 83-92

Bert, V., Macnair, R., De Laguerie, P., Laprade, S., Petit, D. 2000. Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (*Brassicaceae*). *NewPhytology*. **146**: 225-233.

Bert, V., Laprade S., De Laguerie P., Petit, D. 2002. Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than thosefrom metallicolous populations? *NewPhytology*. **155**: 47-57.

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

Biosorption Technology [publicación en línea]. Disponible en Internet en: http://biosorption.mcgill.ca/BT/BTbrief.htm. [Fecha de acceso: 21 de septiembre, 2011]

Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D., Lacoux, J., Fliniaux, M., Dubreuil, A. 2000. Tropane alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing *rol* A, B, C genes only. *Journal of. Biotechnology*. **81**: 157-158.

Boominathan, R., Doran, P. 2003. Organic acid complexation, heavy metal distribution and the effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species. *Journal of Biotecnology*.**101**: 131-146.

Broadhurst, L., Chaney, R. Angle, S., Maugel, T., Erbe, E., Murphy, C. 2004. Simultaneous Hyperaccumulation of Nickel, Manganese, and Calcium in *Alyssum* Leaf Trichomes. Environ. *Sci. Techno*l. **38**:5797-5802

Broadley, M., White, P., Hammond, P., Zelko, I., Lux, A. 2007. Zinc in plants. *Transley Review*. **173**: 677-702.

Brooks, R. R., Morrison, R. S., Reeves, R.D., Dudley, T.R., Akman, Y. 1979.
Hyperaccumulation of Nickel by *Alyssum Linnaeus* (Cruciferae).*Proceedings of the Royal Society of London.***203**: 387-403.

Brown, P. H., Welch, R. M., Cary, E. E. 1987. Nickel: Amicronutrient Essential for Higher Plants. *Plant Physiol.***85**:801-803.

Chen, C., Huang, D., Liu, J. 2009. Functions and Toxicity of Nickel in Plants:
Recent Advances and Future Prospects. Clean. 37: 304-313.

Chi, M; Echeverría, S; Kay, J; Acerito, E; Rodríguez, Z. 2004. La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* como herramienta biotecnológica. *Ciencia*. 61-68.

Chuan, M. C; Shu, G. Y; Liu, J. C. 1996. Solubility of heavy metals in a contaminated soil: Effects of redox potential and pH. *Water, Air and Pollution*.**90**:543-556.

Clemens, S., Palmgrend, G., Krämer, U., 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plants Science*.**7**: 309-315.

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

CNA. Comisión Nacional del Agua. Estadísticas del agua en México, Edición 2010. Disponible en: http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Contenido/Documentos/EAM2010_Espanol_16Junio2010.pdf

COPO, CONSEJO DE POBLACION DEL DISTRITO FEDERAL. Disponible en Internet en: http://www.copo.df.gob.mx/calendario/calendario_2004/marzo/agua.html.

Das, N. 2010. Recovery of precious metals through biosorption – A review. *Hydrometallurgy*. **103**:180-189.

De Jesús G. R. 2011. Bioacumulación de níquel en raíces de plantascompletas y en raíces pilosas de la especiehiperacumuladora *Alyssum lesbiacum*. UNAM. Instituto de Biotecnología.

Demian Cervantes, F. 1999. Estudios de ecotoxicidad, biorremediacion y fito-biorremediacion en suelos contaminados con hidrocarburos (diesel). UNAM. Facultad de Ciencias.

Departamento de Agricultura de los E.U.A., 2002. Disponible en Internet en : http://www.ars.usda.gov/is/pr/2002/020109.htm

Dermirbas, A. 2008. Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: A review. *Journal of Hazardous Materials***157**:220–229

Dive, C., Cox, H. Watson, J. Workman, P. 1988. Polar fluorecsein derivatives as improved substrate probes for flow cytoenzymological assay of cellular esterases. *Molecular and cellular probes*.**2**: 131-145.

Duffus, J. 2002. "Heavy Metals"- A Meaningless Term? (IUPAC Technical Report).*Pure Appl. Chem*. **74**:793-807.

Duruibe, J., Ogwuegbu, M., Egwurugwu, J.2007.Heavy metal pollution and human biotoxic effects.*International Journal* of *Physical Sciences*.**2**:112-118.

Dushenkov, V., Kumar, N., Motto, H., Raskin, I. 1995. Rhizofiltration: The use of Plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environ. Sci. Technol*. **29**:1239-12445.

Duda-Chodak, A. y Blaszczyk, U. 2008. The impact of nickel on human health.*Journal Elementol*. **13**: 685-696.

Eapen, S. y D'Souza, S. 2005. Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals.*Biotechnology Advances*. **23**:97-114.

EPA. Environment Protection Agency. 1992. Terms of Environment Glossary Abbreviations And Acronyms [en línea]. Disponible en: http://nepis.epa.gov Fecha de acceso: 5 de octubre de 2011.

EPA. Environment Protection Agency. 2005. Toxicological reviewof zinc and compounds. Disponible en: http://www.epa.gov/iriswebp/iris/toxreviews/0426-tr.pdf

EPA. Environment Protection Agency. 2007. Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods. METHOD 7000B, FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY [en línea].

Disponible en: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/online/index.htm Fecha de acceso: 11 de octubre de 2011.

EPA. Environment Protection Agency. 2007. Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods METHOD 7010, GRAPHITE FURNACE ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY [en línea]. Disponible en: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/online/index.htm Fecha de acceso: 11 de octubre de 2011.

EPA. Environment Protection Agency. 2007. Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods. METHOD 3015A, MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF AQUEOUS SAMPLES AND EXTRACTS [en línea].Disponible en: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/online/index.htm Fecha de acceso: 11 de octubre de 2011.

Febrianto, J., Kosasih, N. A., Sunarso, J., Ju, H. Y., Indraswati, N., Ismadji, S. 2009. Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent:A summary of recent studies. *Journal of Hazardous Materials* **162**:616–645.

Flora of China. Disponible en Internet en: http://www.efloras.org. Fecha de acceso: 23 de septiembre, 2011].

Fry. S. 2001. Plant cell walls. ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES.John Wiley & Sons. 1-11.

Gallego, M., Benavídes, P., Tomarao, L. 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science*. **121**: 151-159.

Giri, A. y Narasu, L., M. 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances* **18** 1–22.

Goodall, H. y Johnson, M. 1982. Use of carboxyfluorescein diacetate to study formation of permeable channels between mouse blastomeres.*Nature*. **295**: 524-526.

Hansen, E.; Lassen, C. 2003. Cadmium review. Nordic Council of Ministers. **324**:1-24.
INE. Instituto Nacional de Ecología. Fuentes de contaminación en México. Disponible en Internet en: http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/372/fuentes.html

Informe de Minería Mexicana 2006. Disponible en: http//www.economia.gob.mx/pics/p/p1032/inf2006.pdf

Ingle, A. R., Mugford, T. S., Ress, D. J., Cambell, M. M. Smith, C. A. 2005. Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants. *The Plant Cell*.**17**: 2089-2106.

Ingle, A. R., Fricker, M., Smith, C. 2008.Evidence for nickel/proton antiport activity at the tonoplast of the hyperaccumulator plant *Alyssum lesbiacum*.*Plant Biology*. **10**:1435-8603

Kapoor, A., Viraraghavan, T. 1998. Biosorption of heavy metals on Aspergillu niger: effect of pretreatment. *Bioresource Technology*. **63**: 109-113.

Karlik y Szpakowska, 200. Labile Organic Matter and Heavy Metals in Waters of Agricultural Landscape. *Polish Journal of Environmental Studies*.**10**:85-88

Kidd, P. S., Becerra C. C., García L. M., Monterroso, C. 2007. Aplicación de plantas hiperacumuladoras de níquel en la fitoextracción natural: el género *Alyssum* L. *Ecosistemas***16**.

Kopittke, M.P, Pax, F, Blamey,C., Asher, J., Menzies, W. 2010. 954Trace metal phytotoxicity in solution culture: a review. *Journal of Experimental Botany*.**61**:945–954.

Krämer, U. 2005. MTP1 mops up excess zinc in *Arabidopsis* cell. *Trends in Plant Scince*.**10**: 313-315.

Krämer, U. 2010. Metal Hyperaccumulation in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol*. **61**:517–34.

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

Küpper, H., Lombi, E., Zaho, F., Wieshammer. G., McGrath, P. 2001. Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum, Alyssum bertolonni and Thlaspi goensingense*.*Journal of Experimental Botany*.**365**: 2291-2300.

Lasat, M., Baker, M, J., Kochian, 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.

Lugo-Rodríguez, A. 2007. Estudio comparativo del crecimiento y la morfogénesis de las raíces de *A. thaliana* intactas y transformadas por *A. rhizogenes*. Tesis de Licenciatura. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. UDG. Guadalajara, Jalisco.

Lukowitz, W., Gillmor, C.S., Scheible, W.R. 2000.Positional cloning in Arabidopsis. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiology* **123**: 795-805.

Madigan, T., Martinko, M., Parker. 2001. Brook. Biología de los Microorganismos. Prentice Hall. España. pp 591-593.

Mulligan, C. N. Yong, R. N., Gibbs B.F. 2001. Remediation technologies for metal contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*. **60**: 193-207.

Nedelkoska, V., Doran, M. 2000. Hyperaccumulation of Cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnology and Bioengineering*.**67:** 607-615.

Nedelkoska, V. y Doran, M. 2001. Hyperaccumulation of nickel by hairy roots of *Alyssum* species: comparison with whole regenerated plants. *Biotechnol. Prog*. **17**: 752-759.

Nieboer, E y Richarsond, D. 1980.The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically andchemically significant classification ofmetal ions.*Environmental Pollution* **1**:3-26.

Nilsson, O., Touminen, H., Sundberg, B., Olsson, O. 1997. The *Agrobacterium rhizogenesrolB* and *rolC* promoters are expressed in pericycle cell competent to serve as root initials in transgenic hybrid aspen. *Physiologia Plantarum*. **100**:456-462.

Nuñez, L., Meas, V., Ortega, B., Olguín J., 2004. Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones. *Ciencia*. 69-82

Perr, A., Baxter, R., Richards, L. Freeman, L., Murphy, S., 2006. Phytoremediation and hyperaccumulator plants in Molecular Biology of Metal Homeostasis and Dotoxification. **14** 299-340.

Pilon-Smits,E. 2005, Phytoremediation. Annual Review. *Plan. Biology*. **56**:15:39.

Pletsch, M., Santos de Arujo, B., Charlwood, V. 1999. Novel biotechnological approaches in environmental remediation research.*Biotechnology Advances*. **17**: 679-687.

Prassad, V y Freitas, O. 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*.**6**.

Psaras, K. G., Constantindis, TH., Cotsopoulos, B., Manetas, Y. 2000. Relative Abundance of Nickel in the Leaf Epidermis of Eight Hyperaccumulators: Evidence that the Metal is Excluded from both Guard Cells and Tricomes. *Annals of Botany*. **86**: 73-78.

Prieto, M., J., González, R. C., Román G. A., Prieto, G. F. 2009. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*.**10**: 29-44.

Racsio, N. y Navari-Izzo. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science***180**:169–181

Reevs, D, R., Baker, A. J. M. 2000. Metal-Accumulating Plants *in* Phytoremediation of toxic metals. Using Plants to Clean Up the Environment. Eds. Raskin, I. y Enley, B. Ed. John Wiley &Sons, Inc.

RETC, Publicación RETC, 2008. [en línea]. Disponible en http://www.sma.df.gob.mx/sma/links/download/archivos/1er_inf_retc_df_2006.pdf

Rooney, C., Zaho, J-D., McGrath. 2007. Phytotoxicity of nickel in a range of European soils: Influence ofsoil properties, Ni solubility and speciation. *Environmental Pollution***145**:596-605

Sánchez, I. R. 2008.Capacidad de bioacumulación y resistencia a cadmio y zinc de las raíces pilosas de *Arabidopsishalleri*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F.

Senthilkumaar, S., Bharathi S., Nithyanandhi, D., Subburam, V. 2000.Biosorption of toxic heavy metals from aqueous solutions.*Bioresource Technology***75**:163-165

Shanks, V. y Morgan, J. 1999. Plant 'hairy root' culture. *Current opinion in Biotecnology*. **10**:151-155.

Sims, M., Tricia, C., Worth, C. 1993. Biorremediation: Nature's Cleanup Tool. DIANE Publishing. USA. p. 29.

Taiz, L. y Zeiger, E., 1998. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc., Publishers. USA. pp. 792.

Tepfer, D., Metzger, L., Prost. 1989. Use of roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* in rhizosphere research: applications in studies of cadmium assimilation from sewage sludges.*Plant Mol Biol*. **13**(3):295-302.

Trombetta, D., Mondello, M. R., Cimino, F., Cristani, M., Pergolizzi, S., Saija, A. 2005. Toxic effect of nickel in an *in vitro* model of human oral epithelium.*Toxicology Letters* **159**: 219–225.

Tzfira, T. y Citovsky, V. 2002. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *TRENDS in Cell Biology*. **12**: 121-129.

Vaughan, T., Seo, C.W., Marshall, W.E. 2001. Removal of selected metal ions from aqueous solution using modified corncobs. *Bioresource Technology***78**:133–139.

Vieira, H. S. F. R y Volesky, B. 2000. Biosorption: a solution to pollution? *Internat Microbiol*. **3**:17–24.

Volke, S. y Velasco, T. 2002. México. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Ed. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT). Disponible desde Internet en: www.ine.gob.mx. [Fecha de acceso: 21de septiembre, 2011].

Volesky, B. 2001. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for
the next century. *Hydrometallurgy***59**: 203–216.

Volesky, B., 2004. Sorption and Biosorption. Montreal, Canada BV-Sorbex, Inc.

Wang, J y Chen, C. 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotehcnology Advances.***27**: 195–226.

Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffella, J. 2005.Molecular mechanism of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation.*Journal of Trace Elemnts in Medicine and Biology*.**18**: 339-353.

Zhao, J., Lombi, E., Bredon, T., McGrath, P. 2000. Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri.Plant, cell and Enviroment*. **23**:507-514.

Zhao, F., Jiang, R., Dunham, J., McGrath, S. 2006. Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperacumulator *Arabidopsis halleri.New Phytologist*. **172**: 646-654.

Zupan, R. y Zambryski, P., 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiology*. **107**: 1041- 1047.