



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Efecto del cadmio sobre tejido vegetal:
Masa de células no diferenciadas
(callos, *Phragmites australis*)**

Tesis

Que para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta

Daniela Fuerte Martínez



CIUDAD DE MÉXICO

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Durán Domínguez de Bazúa María del Carmen
VOCAL:	Ramírez Burgos Landy Irene
SECRETARIO:	Bernal Lugo Irma Ofelia
1ER. SUPLENTE:	Bernal González Marisela
2DO. SUPLENTE:	Olivera Flores Teresa de Jesús

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorios 301, 302 y 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental, Departamento de Ingeniería Química, Edificio E-3 Alimentos y Química Ambiental y Laboratorio de Cultivos Vegetales, Departamento de Bioquímica, Edificio E-1 Bioquímica y Farmacia. Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, México

ASESOR DEL TEMA:

Dr.-Ing. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Teresa de Jesús Olivera Flores

SUSTENTANTE:

Daniela Fuerte Martínez

DECLARATORIA

Declaro conocer el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, plasmada en la Legislación Universitaria en las definiciones de integridad y honestidad ahí especificadas, aseguro mediante mi firma al calce que el presente trabajo es original y enteramente de mi autoría. Todas las citas de, o referencias a, la obra de otros autores aparece debida y adecuadamente señalados, así como acreditadas mediante los recursos editoriales convencionales.

Sustentante

Daniela Fuerte Martínez

Reconocimientos institucionales

A la Facultad de Química y a la UNAM que, a través de los dineros de todos los mexicanos (de donde viene el presupuesto de la UNAM), me ha brindado todos los materiales e instrumentos para llevar a cabo mi aprendizaje de la carrera y para la realización de esta tesis.

A la Facultad de Química de la UNAM que, a través de la Secretaría Académica de Investigación y Posgrado, SAIP, dio apoyo para reactivos y materiales a través de los profesores Carmen Durán y Enrique Bazúa, claves 5000-9065 y 5000-9067, los cuales apoyaron la fase experimental de la tesis teórico-experimental realizada.

Al Jurado designado por la Facultad de Química quienes revisaron y aprobaron este documento.

Al personal de la mina cooperante por su apoyo logístico, por la información sobre el proceso y los datos del agua proveniente de la operación unitaria de flotación y, especialmente, por el envío de las muestras para la realización experimental inicial de esta investigación que ya no pudo avanzar más por la pandemia del Covid-19.

Al personal administrativo y académico de los Laboratorios 301, 302 y 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental del Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Química de la UNAM quienes apoyan la parte experimental de esta investigación, aunque como ya mencioné yo realicé una parte experimental y el resto teórico basada en mucho en esa información experimental que se realiza en los Laboratorios.



Agradecimientos

A la Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa y a la M. en C. Teresa de Jesús Olivera Flores por brindarme su asesoría, apoyo y colaboración para la realización de este trabajo de tesis. De igual manera les agradezco por su paciencia, sus valiosas aportaciones y toda la ayuda que me han brindado. En especial, a la Maestra Olivera por continuar manteniendo y cuidando los materiales biológicos que con tanto esfuerzo se lograron y que siguen vigentes para quienes vienen en el relevo

Al jurado designado por su valioso apoyo académico de revisión de este documento y sus valiosas aportaciones

De igual manera agradezco a todo el personal académico quienes con su apoyo y enseñanzas constituyen la base de mi formación profesional

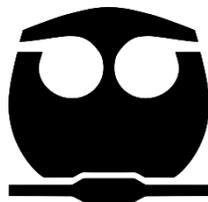
A mis padres que siempre me impulsaron a estudiar y me han apoyado en todo momento a lo largo de mi vida, y que siempre han sido un soporte importante para mí

Y a mis amigas, amigos y compañeros que me han acompañado a lo largo de mi vida académica brindándome su apoyo incondicional

Dedicatorias

Para la señora que todos los días me preguntaba ¿cuándo vas a acabar esa tesis?

Ya acabé, ma.



Cultivo de tejidos vegetales

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Declaratoria	3
Reconocimientos	4
Glosario y abreviaturas	10
Resumen / <i>Abstract</i>	14
1. Problemática	15
1.1. Justificación	15
1.2. Hipótesis	16
1.3. Objetivos	16
1.3.1. Objetivo general	16
1.3.2. Objetivos particulares	17
2. Marco teórico	18
2.1. Minería	18
2.2. Industria minera en México	19
2.3. Contaminación minera en México	21
2.4. Elementos potencialmente tóxicos, EPT	22
2.5. Cadmio	23
2.6. Humedales artificiales	24
2.7. Cultivo de tejidos vegetales	26
2.8. Cultivo de callos	28
2.8.1. Composición de medios de cultivo	29
2.8.2. <i>Explantes</i>	33
2.8.3. Condiciones de preparación de medios de cultivo	33
2.8.4. Condiciones de incubación	34
2.8.5. Evaluación del crecimiento de los cultivos celulares	34
2.9. Modelo biológico: <i>Phragmites australis</i>	36
3. Materiales y métodos	39
3.1. Etapa I. Obtención de plantas donadoras de <i>explantes</i>	41
3.2. Etapa II. Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de callos	43
3.2.1. Medio de cultivo	43
3.2.2. Métodos de desinfección	45
3.2.3. Limpieza, corte y siembra de <i>explantes</i>	47
3.2.4. Incubación	47
3.3. Etapa III. Caracterización de cultivo para determinar su cinética de	48

	Pág.
crecimiento	
3.3.1. Establecimiento de muestras de callo	48
3.3.2. Registro de la masa de cada muestr	48
3.3.3. Evaluación del crecimiento mediante su masa	49
3.4. Etapa IV. Evaluación de la toxicidad del cadmio sobre el crecimiento de callos	49
3.4.1. Preparación del medio de cultivo con cadmio	49
3.4.2. Selección y siembra de callo	50
3.4.3. Registro de la masa de cada muestra	50
3.4.4. Evaluación estadística de datos	50
3.5. Etapa V. Regeneración de las plantas a partir de los callos	50
4. Resultados y discusión	51
4.1. Etapa 1. Obtención de plantas donadoras de <i>explantes</i>	51
4.2. Etapa 2. Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de callos	51
4.2.1. Métodos de desinfección	51
4.2.2. Medios de cultivo con diferentes concentraciones de 2,4-D	52
4.2.3. Incubación y obtención del callo	52
4.3. Etapa 3. Caracterización del cultivo para determinar su cinética de crecimiento	52
4.4. Etapa 4. Evaluación de la toxicidad del cadmio sobre el crecimiento de los callos	53
4.4.1. Análisis estadístico del crecimiento de callo expuesto	54
4.5. Etapa 5: Regeneración de la planta a partir de los callos	56
4.6. Discusión final	57
5. Conclusiones y perspectivas	63
5.1. Conclusiones	63
5.2. Perspectivas	64
5.3. Recomendaciones para investigaciones futuras	64
Anexos	66
Anexo 1. Datos experimentales	66
Anexo 2. Análisis estadísticos	69
Anexo 3. Composición de sales para preparación de medios de cultivo	71
Anexo 4. Disposición controlada de los residuos de esta investigación	73
Referencias bibliográficas	74

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1. Sistema conceptual de un humedal artificial (Durán-de-Bazúa, 1998)	25
Figura 2.2. Etapas de morfogénesis de tejidos vegetales inducidas mediante reguladores de crecimiento en cultivos <i>in vitro</i> (modificada de Hussain et al., 2012)	27
Figura 2.3. Callo inducido a partir de tejidos vegetales de <i>Phragmites australis</i> (fotografía de la autora)	28
Figura 2.4. Curva de crecimiento típica: A) Fase lag, B) Fase exponencial, C) Fase estacionaria, D) Fase de muerte (Imagen de la autora)	35
Figura 2.5. <i>Phragmites australis</i> (cortesía de Oswaldo Téllez-Valdés, CONABIO, 2009)	37
Figura 3.1. Localización de los LIQAYQA (Edificio E-3 Alimentos y Química Ambiental y del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (Edificio E-1 Bioquímica y Farmacia) en el Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM	39
Figura 3.2. Localización del humedal artificial (CCH-Sur, 2014)	40
Figura 3.3. Metodología general	42
Figura 3.4. Partes de la planta <i>Phragmites australis</i> de las cuales se extrajeron los <i>explantes</i>	43
Figura 3.5. Reactor de PVC para el crecimiento de las plantas acuáticas	43
Figura 4.1. Cinética de crecimiento de los callos	53
Figura 4.2. Crecimiento promedio de callo para cada concentración de cadmio	54
Figura 4.3. Estadios de diferenciación de callo a planta de <i>Phragmites australis</i> . (a): callo embriogénico. (b): Germinación de embriones somáticos híbridos de callo con hojas y raíces en direcciones no definidas	56
Figura 4.4. Acercamiento de las plántulas y plantas de carrizo	57
Figura 4.5. Seguimiento fotográfico: a) Callos embriogénicos, b) Germinación de embriones c) Plántulas de carrizo, d) Plantas completas crecidas y mantenidas en medio líquido	58
ÍNDICE DE TABLAS	
Tabla 2.1. Componentes de un medio cultivo para tejido vegetal (Osorio-García, 2018)	30
Tabla 2.2. Taxonomía de <i>Phragmites australis</i> (Parker, 2008)	37
Tabla 3.1. Preparación de la solución nutritiva	44
Tabla 3.2. Composición de los medios de cultivo (se resaltan en negritas el compuesto y composición diferente con respecto del medio de	44

	Pág.
cultivo anterior)	
Tabla 3.3. Métodos de desinfección probados para el establecimiento de los cultivos <i>in vitro</i> de <i>Phragmites australis</i>	45
Tabla 3.4. Volumen de solución de cadmio, 10.0 mg/L, añadida para cada concentración de cadmio en los medios de cultivo	49
Tabla 4.1. Procedimiento P1: Medios de cultivo sembrados con explantes desinfectados con los métodos de D1 y D2	51
Tabla 4.2. Callo inducido en los procedimientos P1 y P2 utilizando los medios de cultivo M1 y M2	52
Tabla A-1.1. Masa de callo medida para determinar cinética de crecimiento	66
Tabla A-1.2. Masa de callo medida cada semana en los medios de cultivo con diferente concentración de cadmio	66
Tabla A-1.3. Promedio de masa de callo medida cada semana en los medios de cultivo por cada concentración de cadmio	67
Tabla A-1.4. Desviación estándar de masa de callo medida cada semana en los medios de cultivo por cada concentración de cadmio	68

GLOSARIO

Elemento	Definición
Callo	Masa amorfa de células no diferenciadas
Carrizos	Vegetación emergente utilizada en humedales artificiales. Su nombre científico es <i>Phragmites australis</i>
Cefotaxime	Antibiótico del grupo de las cefalosporinas de tercera generación. (Tablas 3.2, 3.3)
Citocininas	Reguladores de crecimiento que estimulan la división celular
Desdiferenciación	Por primera vez, investigadores han inducido células diferenciadas para que reviertan el proceso y vuelvan a ser células troncales. Aunque se sabe que tal desdiferenciación ocurre en sistemas naturales, los científicos nunca antes habían imitado el proceso en el laboratorio (https://www.hhmi.org/news/se-inducen-c-lulas-desdiferenciarse-para-que-vuelvan-ser-c-lulas-troncales)
Desinfectante	Sustancia que sirve para quitar a algo la infección o la propiedad de causarla, destruyendo los gérmenes nocivos o evitando su desarrollo
Antiséptico	Sustancia que se usa para combatir o prevenir los padecimientos infecciosos destruyendo los organismos patógenos que los causan
Dicamba	Herbicida selectivo con actividad de auxina en bajas

Elemento	Definición
Espadañas o tules <i>Ex-plante</i>	concentraciones (Tabla 3.2) Vegetación emergente utilizada en humedales artificiales. Su nombre científico es <i>Typha latifolia</i> Porción del tejido, órgano o células de las que se inicia un cultivo <i>in vitro</i> vegetal
Fase de muerte	La tasa de mortalidad es superior a la de natalidad, por lo cual la concentración celular disminuye. Además, se registra una disminución de la biomasa unitaria como resultado de un incremento en la proporción entre respiración y fotosíntesis y a la ausencia de nutrientes, que conlleva a la muerte o lisis celular (concentración, recuento celular, etc.) (Osorio-García, 2018)
Fase estacionaria	Durante esta fase las condiciones de cultivo son limitantes y la natalidad es igual a la mortalidad, por lo cual la concentración celular y los componentes de la biomasa permanecen sin cambios relevantes (Osorio-García, 2018)
Fase exponencial	Durante este periodo la velocidad de crecimiento adquiere su valor máximo y, en vista de la falta de factores limitantes, permanece aproximadamente constante. Por este motivo, la concentración celular aumenta rápidamente (Osorio-García, 2018)
Fase lag o fase de adaptación	El comportamiento inicial depende de las condiciones de las células del inóculo, de las cuales depende también el éxito del nuevo cultivo. El objetivo de esta fase es preparar a las células para el proceso de división celular (Osorio-García, 2018)
Gelzan (Gellan Gum) Giberelinas <i>in vitro</i>	Polisacárido soluble en agua que permite la gelificación de medios de cultivo Experimentos realizados en cajas de Petri u otros materiales de vidrio a diferencia de los que se hacen directamente con seres vivos (<i>in vivo</i>) o que usan paqueterías de cómputo (<i>in silico</i>)
Jales	Palabra de origen mexicano o náhuatl (<i>xalli</i> , arenas finas, según Cabrera, 2002). De acuerdo con la NOM-141-SEMARNAT-2003 se definen como: Residuos sólidos generados en las operaciones primarias de separación y concentración de mineral
Juncos	Vegetación emergente utilizada en humedales artificiales. Su nombre científico es <i>Scirpus</i> spp.
Masa Nistatina	Propiedad intrínseca de los cuerpos. Se mide en kg Antimicótico de actividad fungistática (Tabla 3.2)
Peso Presa de jales	Fuerza que se aplica a los cuerpos. Se mide en Newtons Obra de ingeniería para el almacenamiento o disposición final de los jales, cuya construcción y operación ocurren simultáneamente. Existe en México una norma específica para

Elemento	Definición
	estas construcciones: La Norma Oficial Mexicana NOM-141-SEMARNAT-2003, que establece el procedimiento para caracterizar los jales, así como las especificaciones y criterios para la caracterización y preparación del sitio, proyecto, construcción, operación y postoperación de presas de jales (DOF, 2003)
Terbinafina	Antimicótico de amplio espectro que actúa inhibiendo el crecimiento de los hongos (Tabla 3.3)
Tezontle	Palabra que viene del mexicano o náhuatl y significa piedra ligera como los cabellos (<i>tetl</i> = piedra, <i>tzontli</i> = cabellos) de origen volcánico muy ligera y porosa
Totipotente	Adjetivo aplicado a la célula totipotente. 1. f. Biol. célula embrionaria con capacidad para generar un organismo completo (https://dle.rae.es/c%C3%A9lula#EcWiTwr)
Tule	Palabra que viene del mexicano o náhuatl, <i>tulli</i> , que nombra a las plantas acuáticas que proliferaban abundantemente en la cuenca lacustre de México

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Herbicida sistémico hormonal auxínico usado comúnmente en el control de malezas de hoja ancha
ABA	Ácido abscísico (Tabla 2.1)
AG3	Giberelinas
AIA	Ácido indol acético (Tabla 2.1)
AIB	Ácido indol butírico (Tabla 2.1)
ANA	Ácido naftalenacético (Tablas 2.1 y 3.2)
Auxina	Fitohormona para inducción de callo (Tabla 3.2)
BA	Bencil amino purina (Tablas 2.1, 3.2)
B5 (sales)	Sales para la preparación de medio de Gamborg (Gamborg et al, 1968) (Tabla 3.2)
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
EPT	Elementos químicos potencialmente tóxicos. Se refiere a los elementos esenciales y no esenciales que pueden generar síntomas de toxicidad e inhibición del crecimiento celular (Dietz et al., 1999)
et al.	Abreviatura de las palabras en latín <i>et altere</i> que significan “y otros” que por el frecuente uso de su abreviatura ya no se ponen con cursivas (como <i>et cetera</i> , etc.)
IUPAC	Siglas en inglés para <i>International Union of Pure and Applied</i>

ABREVIATURAS

LIQAYQA	<i>Chemistry</i> , Unión Internacional de Química Pura y Aplicada Laboratorios de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental (UNAM, Facultad de Química, Departamento de Ingeniería Química, México)
M1,M2,M3,M4	Medios de cultivo 1, 2, 3, 4 respectivamente (Tabla 3.2)
MS	Medio de sales y vitaminas (Murashige y Skoog, 1962) (Tabla 3.2)
NIST	Siglas en inglés para <i>National Institute of Standards and Technology</i> de los Estados Unidos (Instituto Estadounidense de Normas y Tecnología)
NIST Standard Reference Material	Material de referencia estándar del Instituto Estadounidense de Normas y Tecnología
PVC	Siglas en inglés para el polímero sintético de cloruro de polivinilo (<i>polyvinyl chloride</i>)
PVP	Polivinilpirrolidona (Tabla 2.1)
SRM	Siglas en inglés para material de referencia estándar (<i>Standard Reference Material</i>)
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
USEPA	Siglas en inglés para <i>United States Environmental Protection Agency</i>

Nota:

Esta tesis usa el punto decimal (DOF, 2009)

Esta tesis usa los símbolos % y °C junto al número y las abreviaturas de las locuciones latinas *etcetera* y *et altere* sin cursivas



Resumen

Para resaltar la presencia de los metales pesados como elementos potencialmente tóxicos (EPT) existentes en el agua de proceso de una industria minera cooperante se planteó el uso del cadmio como un indicador ambiental de la toxicidad especialmente para plantas hidrófitas que estén en contacto con el agua corriente de proceso para depurarlo. Con la finalidad de evaluar el efecto tóxico del cadmio en plantas acuáticas se usó el carrizo (*Phragmites australis*) y se propuso realizar un ensayo *in vitro* exponiendo células de callo de esta especie vegetal a diferentes concentraciones de cadmio (0, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6 mg/L, las encontradas en los fluentes de una mina cooperante). Se implementó un protocolo con una serie de metodologías para la instalación de reactores, corte de tejidos, desinfección de *ex-plantas* y composición de medios de cultivo a probar simultáneamente para la elección óptima y sucesiva de las condiciones más favorables para la inducción, desarrollo y evaluación del crecimiento de callo. Se logró el establecimiento de cultivos celulares de callo de *Phragmites australis* con los que se realizó la evaluación del efecto tóxico, *encontrándose que el cadmio no afectó el crecimiento del callo dado que no se abatió a las diferentes concentraciones en estudio.*

Palabras clave: Cadmio, tejido vegetal, masa de células no diferenciadas o callos, carrizos o *Phragmites australis*

Abstract

*To highlight the presence of heavy metals as potentially toxic elements (PTEs) existing in the process water of a cooperating mining industry, the use of cadmium was proposed as an environmental indicator of toxicity, especially for hydrophytic plants that are in contact with a water process stream for cleaning it. In order to evaluate the toxic effect of cadmium on a reed (*Phragmites australis*), it was proposed to carry out an *in vitro* test exposing callus cells of the plant species under study to different concentrations of cadmium (0, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6 mg /L found in the effluents of the cooperating mine). A protocol was implemented with a series of methodologies for the installation of reactors, tissue cutting, disinfection of ex-plants and composition of culture media to be tested simultaneously for the optimal and successive choice of the most favorable conditions for induction, development and assessment of callus growth. The establishment of cell cultures of Phragmites australis callus was achieved, with which the evaluation of the toxic effect was carried out. Findings indicate that cadmium did not affect the growth of the callus since it did not collapse at the different concentrations under study.*

Keywords: Cadmium, plant tissue, undifferentiated cell mass, callus, *Phragmites australis*

Capítulo 1

Problemática

1.1. Justificación

La actividad minera en México es uno de los principales contribuyentes del sector en el mundo, ocupando el primer lugar en la producción de plata a nivel mundial y siendo uno de los 10 principales productores de 16 diferentes minerales. Sin embargo, la minería representa un fuerte impacto ambiental debido a la liberación de metales pesados los cuales son considerados elementos potencialmente tóxicos (Cárdenas, 2013; Ruiz-López, 2009).

En estudios previos realizados en los Laboratorios de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental (LIQAyQA) se ha resaltado la presencia de esos elementos potencialmente tóxicos en el agua de proceso de una industria minera cooperante del estado de México y la problemática generada por la acumulación de dichos elementos al reutilizar el agua de proceso en la operación unitaria de flotación para extraer y concentrando algunos metales y afectando la flotación selectiva de los minerales de interés (Ruiz-López, 2009).

Para el estudio del impacto de los elementos tóxicos en las aguas reutilizadas, se ha utilizado como herramienta al componente vegetal de los humedales artificiales, los cuales son zonas diseñadas y construidas en las que, de forma controlada, se emplean plantas acuáticas para la eliminación de contaminantes presentes en aguas residuales mediante procesos físicos, biológicos y químicos. Considerando la problemática ambiental de la mina cooperante, se ha propuesto la instalación de humedales artificiales como sistema de remediación de la contaminación en el agua excedente de su proceso de concentración de los minerales la cual es enviada a un cuerpo receptor pre-construido conocido como presa de jales (Ruiz-López, 2009).

Sin embargo, se desconocen los mecanismos mediante los cuales interactúan los elementos potencialmente tóxicos y las plantas del humedal, así como el efecto tóxico que dichos elementos pueden provocar en las plantas.

Con el objetivo de evaluar el posible efecto de los elementos potencialmente tóxicos contenidos en el agua que la mina obtiene del proceso de flotación sobre las plantas hidrofitas que se establecerían en el humedal artificial, se propuso realizar un ensayo en el que se eligió al cadmio como metal indicador potencialmente tóxico y a la planta hidrofita conocida coloquialmente como carrizo, *Phragmites australis*, como material biológico.

1.2. Hipótesis

El crecimiento del callo de *Phragmites australis* no se ve afectado cuando es sometido a diferentes concentraciones del cadmio equivalentes a las encontradas en el agua que sale de la operación unitaria de flotación de la mina cooperante.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

El objetivo general de esta investigación fue:

- Evaluar el efecto del cadmio sobre el crecimiento de callo de *Phragmites australis*

1.3.2. Objetivos particulares

Los objetivos particulares fueron:

- Establecer las condiciones para el crecimiento de plantas donadoras de *explantes* de *Phragmites australis* bajo condiciones *ex vitro*.
- Evaluar diferentes métodos de desinfección de nodos de los tallos de *Phragmites australis*
- Seleccionar el medio de cultivo para la inducción del callo de *Phragmites australis*
- Determinar la cinética de crecimiento de callos de *Phragmites australis*
- Evaluar el crecimiento de cultivos de callos a tres diferentes concentraciones de cadmio incluyendo un blanco sin cadmio (0, 0.2, 0.4 y 0.6 mg/L)

A continuación, en el siguiente capítulo se dan algunos conceptos que serán útiles para definir la metodología seguida, para analizar los resultados obtenidos y para sentar las bases que permitan, en una siguiente etapa, elucidar el posible mecanismo que emplea la planta para sobrevivir en un medio acuoso que contenga metales pesados usando uno como indicador, el cadmio.

Capítulo 2

Marco teórico

2.1. Minería

Desde las primeras civilizaciones se han usado cuantiosos minerales para la fabricación de herramientas, armas y ornatos, que demandaron con insistencia el ejercicio de la minería. Esto la convirtió en una de las actividades más antiguas de la humanidad y, con el transcurso de los siglos, se ha convertido en una importante industria. Actualmente se denomina minería a la actividad económica que contempla el conjunto de procedimientos realizados en un yacimiento para obtener recursos de una mina, a través de la extracción, explotación y aprovechamiento de los minerales y combustibles fósiles acumulados en el suelo y subsuelo (Cuéntame de México, 2019).

Durante el transcurrir del tiempo se han creado series de estudios, técnicas y análisis con el objetivo de perfeccionar la exploración y explotación de los yacimientos. Dependiendo del tipo de mineral a extraer la actividad se divide en 3 categorías (Secretaría de Economía, 2011):

- **Minería metalúrgica**
Compuesta por elementos metálicos empleados como materias primas básicas para la fabricación de una variedad de productos industriales. Los principales elementos de interés son, por orden alfabético, aluminio, cobre, hierro, mercurio, níquel oro, plata y plomo.
- **Minería no metalúrgica**
Obtiene materiales para la construcción tales como cemento, cal y granito; minerales industriales como el caolín, bentonita, potasio, azufre y piedras

preciosas, siendo algunas de estas, cuarzos, zafiros, esmeraldas, diamantes, entre otros.

- Minería energética

Le atañen exclusivamente minerales energéticos, empleados principalmente como combustibles, tales como el petróleo, gas natural y carbón o hulla.

2.2. Industria minera en México

La minería en México ha resaltado dentro de su economía desde la época prehispánica hasta la actualidad impactando y determinando la dinámica social y política, tanto al interior del país, como en las relaciones con el exterior (González-Becerra, 2017).

Esta industria denota las características del desarrollo económico del país, ocupando un sitio destacado en la actividad productiva, constituyendo un renglón significativo en diferentes entidades del territorio nacional suministrando los insumos requeridos por la industria manufacturera, estimulando de esta forma la descentralización económica y social (INEGI, 2015).

Así mismo, ha sido un factor importante de modernización para otras industrias, entre las que destacan la construcción, la metalúrgica, la siderúrgica, la química y la electrónica, además de formar parte de la manufactura de maquinaria, equipo y artículos de uso cotidiano.

La identificación histórica entre el país y la minería tiene origen en el patrimonio mineral del territorio nacional, influencia que repercute en la ubicación de asentamientos humanos localizados en su mayor parte en regiones montañosas, áridas y las llanuras costeras (INECC, 2007).

Se reconocen los actuales estados de Guerrero, Morelos, Querétaro, Oaxaca y Chiapas, como las primeras regiones de actividad minera en la época prehispánica, extendiéndose posteriormente a Zacatecas, Hidalgo, Guanajuato y San Luis Potosí en el periodo colonial.

La producción de metales preciosos fue la industria más importante y el motor del crecimiento económico y modernización de la Nueva España, lo que proveyó de dinamismo mercantil a producciones naturales, que de otra manera hubieran quedado reducidas a satisfacer el consumo interno. Fue la plata la que constituyó la producción económica dominante del sector durante dicho periodo, siendo el nexo fundamental con el mercado mundial y base del sistema económico colonial (Kuntz-Ficker, 2010).

Simultáneamente, las formas de producción empleadas en la minería fueron causa de tensiones sociales, mismas que contribuyeron a desencadenar la revolución de 1910 y al establecimiento en la Constitución de 1917, precepto en el que se basa la normativa para el aprovechamiento de los recursos del suelo y subsuelo (López-Bárcenas, 2017).

Al finalizar la Segunda Guerra Mundial, perdió el carácter de columna vertebral de la economía nacional que desempeñó durante cuatro siglos, debido a que las nuevas políticas económicas establecidas en el país que favorecieron el crecimiento de la agricultura comercial y el turismo (Ruiz-López, 2009).

Las siguientes décadas se caracterizaron por el declive de las actividades extractivas, la cada vez menor participación de la minería a pequeña y mediana escala en la actividad, con el advenimiento de las grandes empresas, ahora muchas de ellas transnacionales; así como los bajos precios internacionales de la plata y otros minerales que obligaron al cierre de las minas más pequeñas en el país (Ruiz-López, 2009).

Ha sido hasta los años 2000 en que el repunte en los precios internacionales de metales como el cobre o el zinc (debido en parte a la gran demanda China) ha dado un nuevo auge a la industria minera (Lomelín-Guillén, 2007).

En la actualidad, la actividad minera sigue constituyendo una fuente importante de divisas, con un reciente repunte importante de los metales preciosos que llegaron en 2020 a niveles récord de varios años y como el 2do destino con el presupuesto de exploración más alto de América Latina, tiene una participación importante en la economía del país y es una fuente destacada de empleos que, al cierre de 2020, registró 367,935 empleos formales directos (Secretaría de Economía, 2021). De igual manera, la minería mexicana mantiene una notable contribución a la producción mundial, ocupando el 1er lugar en la producción de plata y se ubica entre los 10 principales productores de 17 diferentes minerales: plata, fluorita, celestita, sulfato de sodio, wollastonita, bismuto, molibdeno, plomo, cadmio, sulfato de magnesio, zinc, diatomita, barita, yeso, sal, oro y cobre (Secretaría de Economía, 2021).

Se prevé que, para las siguientes décadas, el litio sea el mineral clave a explotar por su creciente demanda para la elaboración de baterías, especialmente de autos eléctricos, mercado que se espera sustituya a los autos de combustión interna, lo que elevará la demanda del llamado “nuevo petróleo”. Ante esta situación, se ha amagado una iniciativa para nacionalizar el litio al catalogarlo como una fuente de energía estratégica para el desarrollo económico del país, sin embargo, las acciones al respecto, tanto de legislación como explotación, aún son inciertas (Carbajal, 2021).

2.3. Contaminación minera en México

El financiamiento privado, latente en la minería, se aceleró después de la salida del capital estatal por la aplicación de políticas neoliberales en México, lo que simultáneamente repercutió en la existencia de pocas empresas mineras mexicanas debido a la abertura para inversión de capital extranjero (Ruiz-López, 2009; Tlamayanco-Castro, 2022). Una de las consecuencias de dichas políticas ha sido el

descuido de la conservación del ambiente y la seguridad laboral, dada la laxa normativa mexicana, muchas empresas extranjeras realizan en México prácticas que en su país de origen se encuentran prohibidas o estrictamente reglamentadas (López-Barcenas, 2017; Poy-Solano, 2006).

Todas las etapas que conforman un proceso minero, con excepción de la prospección, que implica estudios preliminares, originan problemas ambientales de alto impacto derivados de la generación de aguas residuales, residuos peligrosos y emisiones a la atmósfera, de tal forma que la industria minera en México ha generado una gran cantidad de desechos y sitios contaminados a lo largo de todo el país (García-Mercado, 2016).

2.4. Elementos potencialmente tóxicos, EPT

El término Elemento Potencialmente Tóxico (EPT) se define como cualquier elemento químico que pueda tener consecuencias nocivas a los seres vivos al exponerse a éstos. Los EPT incluyen elementos de importancia ambiental y/o toxicológica de carácter metálico, no metales y metaloides. Los de mayor importancia ambiental son el As, Be, Cd, Cu, Cr, Hg, Pb, Se, Tl, V y Zn, siendo metales en su mayoría (Volke-Sepúlveda et al., 2005).

En materia de contaminación ambiental a los metales que en estado puro presentan una densidad mayor a 5.0 g/cm^3 y son tóxicos se les define también como “metales pesados”, este término es utilizado con frecuencia para referirse a los EPT metálicos, sin embargo; debido a inconsistencias y confusiones en su descripción y uso, este término no está formalmente reconocido por la *IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)* (Duffus, 2002).

El carácter tóxico de los EPT se debe a la capacidad que tienen para reaccionar e interferir con una serie de sistemas enzimáticos en los seres vivos. Los cationes metálicos divalentes (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+}) son estructuralmente muy

similares entre sí, tienen diámetros iónicos entre 138 y 160 pm y una doble carga positiva. De esta manera, por su semejanza estructural, ciertos cationes metálicos divalentes pueden desplazar a otros con funciones fisiológicas importantes en la célula. Por ejemplo, los iones Hg^{2+} , Cd^{2+} y Ag^+ forman complejos inespecíficos al interior de las células, que interfieren con el adecuado metabolismo celular (Csuros y Csuros 2002).

2.5. Cadmio

El cadmio es un elemento químico metálico considerado un EPT. Es blando, de color blanco azulado y relativamente poco abundante con respecto de otros metales, aún con ello se encuentra en toda la corteza terrestre. Es común hallarle en minas asociado con metales como el zinc, el plomo y el cobre, y nunca en estado puro. Su uso más frecuente es en aleaciones con otros metales para la producción de baterías recargables, pigmentos de uso industrial y en procesos de galvanotecnia (Colaboradores de Wikipedia (1), 2022).

El cadmio produce efectos tóxicos en los organismos vivos, aún en concentraciones muy bajas y no es degradable en la naturaleza, por lo que una vez liberado al ambiente permanecerá en circulación. Esta propiedad, unida a su alta movilidad y poder bioacumulativo, lo convierten en uno de los EPT de mayor importancia en materia de contaminación ambiental, así como un elemento de referencia para estudios de investigación de toxicidad (Hernández-Baranda et al., 2019).

Por tales características, la normativa mexicana establece en las NOM-001-SEMARNAT-1996 y NOM-002-SEMARNAT-1996 (DOF, 1996a,b) los límites máximos permisibles de Cd para descargas en aguas residuales en aguas y bienes nacionales y en los sistemas de alcantarillado urbano o municipal. En el caso del cadmio la NOM-001 indica que rango de concentración puedes ser desde 0.05 hasta 0.4 mg/L dependiendo del uso o disposición final que tenga el agua. Por otra parte, la NOM-002 maneja como límites máximos permisibles de Cd total 0.5 mg/L como

promedio mensual, 0.75 mg/L como promedio diario y 1 mg/L tomado de forma instantánea (DOF, 1996b).

2.6. Humedales artificiales

Siendo un problema persistente la contaminación ambiental tanto de cadmio como de otros EPT consecuencia de la explotación minera, se han propuesto métodos para concentrar dichos elementos y reducir sustancialmente su liberación al ambiente. Uno de los métodos de control y reducción de contaminantes del agua utilizada en los procesos de extracción es la implementación de humedales artificiales (Amábilis, 2015; Amábilis et al., 2016, 2018a,b; Bazúa-Rueda et al., 2020).

Los humedales artificiales son sistemas de fitorremediación conformados por un medio de soporte, la vegetación emergente y/o sub-emergente, organismos vivos y agua, que simulan a un sistema de humedales naturales, con un fin determinado, principalmente para la eliminación de contaminantes presentes en aguas residuales mediante procesos físicos, biológicos y químicos (Hammer y Bastian, 1989; García-Mercado, Ruiz-López et al., 2010).

Estos sistemas son saturados por aguas superficiales o subterráneas con las particularidades de fijar físicamente los contaminantes en la superficie del suelo y la materia orgánica, utilizar y transformar los elementos por medio de microorganismos y lograr niveles de tratamiento consistentes con un bajo consumo de energía y mantenimiento (Salinas-Juárez, 2016).

Los humedales artificiales pueden clasificarse dependiendo de su hidráulica, en humedales de flujo superficial y flujo subsuperficial y con plantas emergiendo, flotando o sumergidas en el agua. En ellos, el agua puede fluir horizontalmente o verticalmente o tener sistemas híbridos (vertical-horizontal). El influente de estos sistemas se alimenta en forma continua por uno de los extremos del humedal como se muestra en la Figura 2.1.

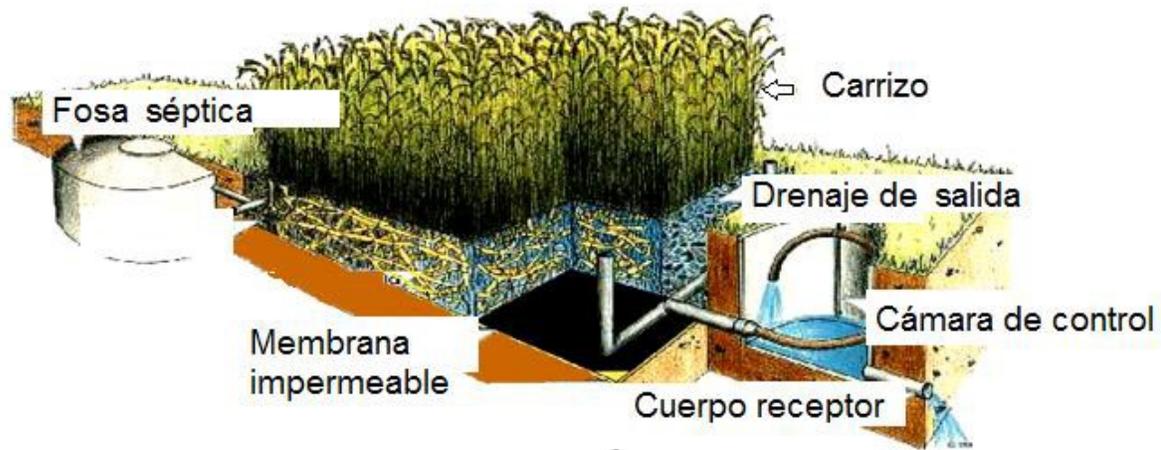


Figura 2.1. Sistema conceptual de un humedal artificial (Durán-de-Bazúa, 1998)

Los humedales consisten habitualmente de uno o más canales de poca profundidad que tienen un recubrimiento de fondo para prevenir la percolación al agua freática susceptible a contaminación y una capa sumergida de suelo para las raíces de la vegetación macrófita (aquella que puede desarrollarse en terrenos inundados) seleccionada. Cada sistema cuenta con estructuras adecuadas de entrada y descarga para asegurar una distribución homogénea del agua residual. La vegetación emergente más utilizada en este tipo de humedales incluye a las espadañas o tules (*Typha* spp.), los juncos (*Scirpus* spp.) y los carrizos (*Phragmites* spp.). El soporte para las plantas debe tener una baja conductividad y no permitir un flujo significativo a través de la zona radicular. La eliminación de contaminantes se produce por medio de reacciones que tienen lugar en el agua y en la zona superior del sustrato, por lo que su potencial eliminación se ve fuertemente restringida (EPA, 2000).

Si bien se ha demostrado que la fitorremediación es eficiente para el tratamiento de aguas residuales, no todas las especies de plantas acuáticas existentes pueden ser utilizadas para tal fin, ya que deben reunir características de resistencia que les

permitan adaptarse al medio y crear las condiciones idóneas para que ocurra el proceso de remoción de los contaminantes de manera sustentable, ya sea absorbiéndolos directamente o favoreciendo su captación mediante microorganismos; siendo así, se desarrolla investigación con el fin de caracterizar las plantas y determinar su compatibilidad con los sistemas de fitorremediación.

2.7. Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta biotecnológica que engloba un conjunto de técnicas a través de las cuales un *explante* vegetal se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. El proceso inicia a partir de *explantes* aislados de cualquier tejido vegetal, aunque tradicionalmente se emplean embriones, raíces y brotes por tener mayor facultad embriogénica (Ochoa-Villarreal et al., 2015). El fundamento radica en las células totipotentes, que tienen la habilidad de que una sola célula pueda expresar el genoma completo por medio de la división celular y su capacidad celular de modificar su metabolismo, crecimiento y desarrollo para poder regenerar una planta completa a partir de un cultivo *in vitro*, sin importar el grado de diferenciación alcanzado (Hussain et al., 2012).

Uno de los principales objetos de dichos cultivos obedece a la necesidad de obtener modelos biológicos que actúen como ejemplares vivos para la implementación de ensayos *in vitro*, brindando ventaja sobre ensayos con ejemplares completos de plantas debido a la repetibilidad de las técnicas con mayor capacidad de control de variables, menor requerimiento de espacio, lo que se refleja en la posibilidad de aumentar la cantidad de ensayos en espacios limitados y la obtención de resultados a corto plazo. Otras aplicaciones frecuentes de los cultivos de tejidos son para la producción a gran escala de metabolitos secundarios, producción de plantas utilizadas como biocombustibles, biorremediación, rescate de especies amenazadas o en vías de extinción y producción agrícola intensiva (Osorio-García, 2018)

Para los diferentes fines mencionados, existen dos técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* más utilizadas, la organogénesis y callogénesis (Figura 2.2). La organogénesis refiere a la producción de órganos de las plantas (raíz, brote, hojas) ya sea directamente de los meristemas, o indirectamente de masas de células desdiferenciadas (callos), tanto para la propagación masiva de las plantas a estudiar como para el crecimiento de órganos particulares de interés (Hussain et al., 2012).

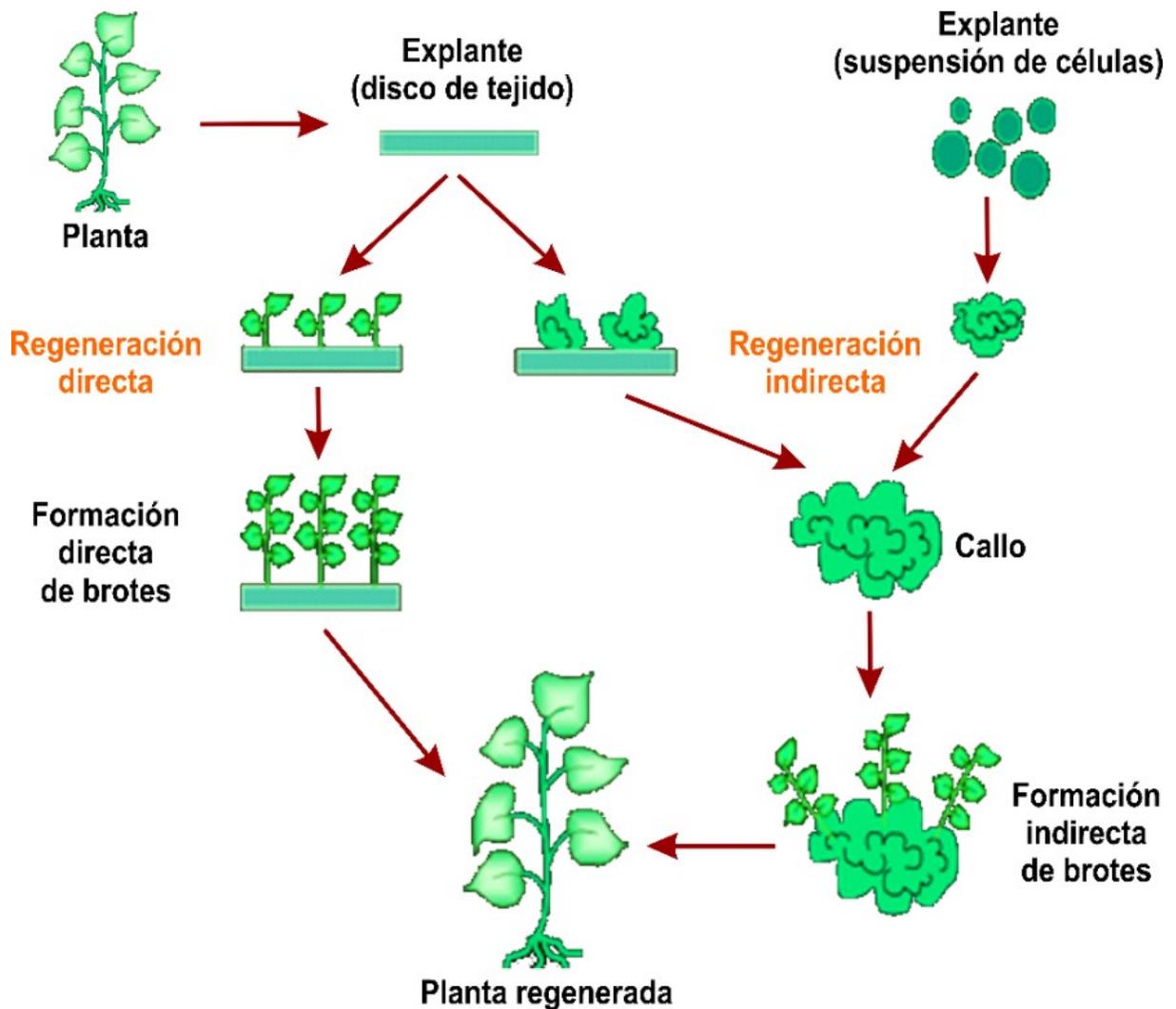


Figura 2.2. Etapas de morfogénesis de tejidos vegetales inducidas mediante reguladores de crecimiento en cultivos *in vitro* (modificada de Hussain et al., 2012)

La callogénesis por otra parte se produce cuando el *explante*, en un medio con concentraciones óptimas de reguladores del crecimiento, prolifera a células desdiferenciadas de callo (Ochoa-Villarreal et al., 2015).

2.8. Cultivo de callos

El cultivo de callos es la inducción y mantenimiento de una masa amorfa (Figura 2.3) de células vegetales no diferenciadas obtenida a partir del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados de una planta madre que, al someterse a un cambio en los niveles de auxinas y citocinas, logran una desdiferenciación celular (Ayala-Vázquez, 2008).

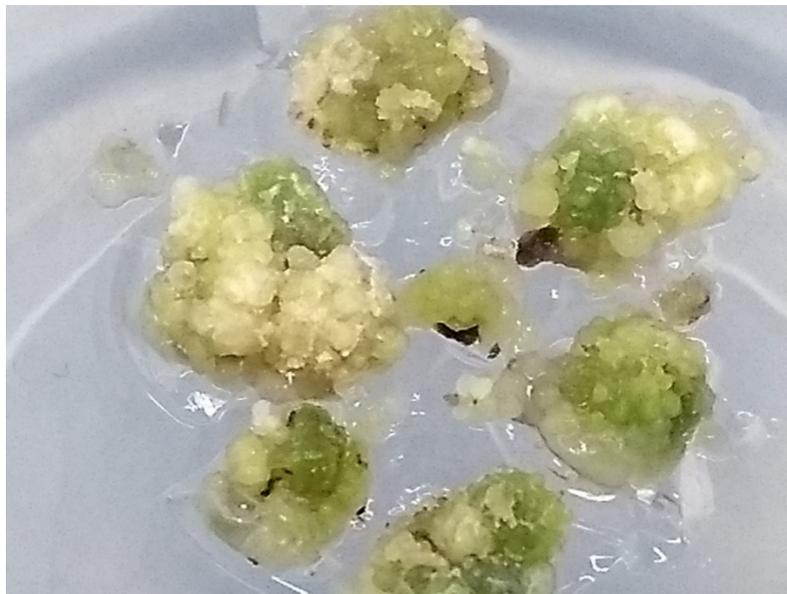


Figura 2.3. Callo inducido a partir de tejidos vegetales de *Phragmites australis* (fotografía de la autora)

Los tejidos de callo por lo general son heterogéneos en su composición celular; es decir, un mismo callo puede presentar varios tipos celulares, la diversidad celular

depende de varios factores como el origen del tejido, edad y composición de los medios (Pérez-Molphe-Balch et al., 1999).

Se ha observado que, tanto los callos establecidos a partir de diferentes órganos de una misma planta como los callos procedentes de un mismo *explante*, llegan a diferir en su morfología y características intrínsecas como color, friabilidad, dureza, tamaño, grado de diferenciación y producción de metabolitos; características que también pueden concentrarse mediante reguladores y manipulación física.

El callo, por ejemplo, puede volverse progresivamente disgregable con subcultivos repetidos, para establecer una suspensión celular en medio líquido (Osorio-García, 2018).

Las características más importantes del callo son:

- Las células totipotentes pueden llegar a formar plántulas completas
- Proliferación continua
- Proliferación acelerada
- Apariencia desorganizada

2.8.1. Composición de medio de cultivo

La morfogénesis en los cultivos de tejidos vegetales *in vitro* puede ser dirigida mediante diversos factores controlables en los medios de cultivo, para promover la formación de órganos, brotes, callos o células en suspensión. Los medios de cultivo vegetales contienen nutrientes requeridos para el crecimiento y el desarrollo de las plantas, a su vez requieren condiciones preparación e incubación específicas, tales como pH, esterilidad, periodos de luminosidad, temperatura, y humedad. Estos están compuestos principalmente de sales inorgánicas, compuestos orgánicos y materiales inertes para soporte (Morales-Rubio et al., 2016). En la Tabla 2.1 se describen

detalladamente la función y ejemplos de los componentes que conforman un medio de cultivo:

Tabla 2.1. Componentes de un medio cultivo para tejido vegetal
(Osorio-García, 2018)

Componente	Ejemplo
Macronutrientes: Elementos y compuestos de mayor demanda que contribuyen a las funciones vitales como la fotosíntesis y respiración	N ₂ : Forma parte de proteínas, ácidos nucleicos y algunas coenzimas. K ⁺ : Regulador de potencial osmótico Mg ²⁺ : Cofactor de enzimas y componente de la clorofila S: Cofactor P: Intermediarios en fotosíntesis y respiración Ca ²⁺ : Síntesis de pared celular
Micronutrientes: Elementos y compuestos de menor demanda encargados de la regulación enzimática.	Mo: Componente de nitrato reductasa. Cu ²⁺ : Transferencia de electrones Zn ²⁺ : Síntesis de auxinas Mn ²⁺ : Cofactor de enzimas fotosintéticas Fe ²⁺ : Transferencia de electrones y componente del citocromo Co: Componente principal en forma de complejo de algunas vitaminas y enzimas I ⁻ : Estimula la nitrificación B ³⁺ : Manteamiento en la pared y membrana celular Na ⁺ : Osmorregulación y equilibrio eléctrico Cl ⁻ : Osmorregulación y liberación de O ₂ a partir de H ₂ O ₂
Compuestos orgánicos: Compuestos de carbono metabolizables para la obtención de energía y regulación osmótica.	Azúcar, manitol y sorbitol: Fuente de carbono e incrementa la presión osmótica, transformándola en hipotónica, dando lugar a la salida agua fuera de la célula
Vitaminas: Precursoras de coenzimas, hormonas que <i>in vivo</i> son sintetizados por una parte u órgano de la planta para luego ser transportadas a otros órganos donde se metabolizan y/o acumulan	Tiamina (B1): Componente esencial de las coenzimas que catalizan la oxidación del ácido pirúvico Piridoxina(B6): Biotransformación Riboflavina(B2): Necesaria para el crecimiento de las raíces Ácido nicotínico(B3): Metabolismo energético Myo-inositol: Mensajero secundario

Componente	Ejemplo
<p>Reguladores de crecimiento: Compuestos que tienen un efecto similar a las hormonas, pero son sintetizados artificialmente y molecularmente son distintos a las hormonas. Altas concentraciones de auxinas generalmente favorecen la formación de raíces, mientras que altas concentraciones de citocininas promueven la regeneración de brotes. Un balance de auxina y citocinina lleva al desarrollo de una masa desdiferenciada de células llamada callo</p>	<p>Auxinas (2,4-D, AIA, AIB, ANA, Dicamba): Promueven la elongación celular, la división celular, la formación de raíces laterales, desarrollo de frutos, diferenciación del tejido vascular. En CTV se emplea para promover la inducción y crecimiento de callo, formación de brotes y raíces y la embriogénesis somática</p> <p>Citocininas (BA, Kinetina): Regulan el ciclo celular, estimulan la morfogénesis y el crecimiento de yemas laterales, promueven la división celular y la formación de cloroplastos, también rompen la dominancia apical. En CTV se emplean para estimular la división celular, formación de brotes y maduración de cloroplastos</p> <p>Giberelinas (AG3): Induce el alargamiento de entrenudos en tallos al estimular la división y elongación celular, retrasa la maduración de los frutos, estimula el crecimiento de los frutos. En CTV se utiliza para el alargamiento de brotes adventicios, la germinación de semillas y, en algunos casos estimula la maduración y germinación de embriones somáticos</p> <p>Ácido abscísico (ABA): Estimula el cierre estomático, inhibe el crecimiento del tallo, en las semillas induce la síntesis de proteínas de almacenamiento, induce el efecto de las giberelinas, así como la senescencia de las hojas, induce y mantiene la latencia. En CTV poco se utiliza, sin embargo, se ha visto que ejerce un efecto sobre la maduración y sincronización de embriones somáticos</p>
<p>Antioxidantes: Moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación debida a la captación de electrones por agentes oxidantes, manteniendo la integridad por mayor tiempo de los tejidos vegetales y el medio de cultivo</p>	<p>PVP: Facilidad para formar complejos, restaurando la actividad de las enzimas reaccionando con los fenoles, los cuales son adsorbidos a través de uniones de hidrógeno</p> <p>Carbón activado: Mediante su adición al medio de cultivo es posible remover compuestos fenólicos. Remueve sustancias inhibitorias o tóxicas del medio de cultivo que son producidas durante la esterilización mediante</p>

Componente	Ejemplo
	<p>autoclave</p> <p>Ácido cítrico y ascórbico: Actúan como compuestos que inhiben o demoran la oxidación, a través de la descomposición de especies reactivas de oxígeno, evitando así las reacciones en cascada de los radicales libres</p>
<p>Antibióticos: Compuestos que matan o impiden el crecimiento de ciertas clases de bacterias sensibles</p>	<p>Cefotaxima, del grupo de las cefalosporinas de tercera generación. Tiene un amplio espectro de acción contra las bacterias</p>
<p>Antimicóticos: Compuestos que matan o impiden el crecimiento de ciertas clases de hongos sensibles</p>	<p>Terbinafina: de amplio espectro, fungicida frente a <i>Aspergillus</i>, <i>Candidaparapsilosis</i>, <i>Malasseziafurfur</i>, <i>Cryptococcusneoformans</i>, hongos dimorfos, algunos agentes de la feohifomicosis, cromoblastomicosis, hialohifomicosis, y micetoma</p>
<p>Gelificantes: Agentes que ayudan a solidificar el medio de cultivo dando soporte al tejido, también ayuda a dosificar la cantidad de agua disponible para los tejidos</p>	<p>Agar: polisacárido sin ramificaciones obtenido de la pared celular de varias especies de algas. Tiene un gran poder gelificante, ya que con cantidades del menos del 1% de materia sólida se obtiene un gel bastante resistente. Los geles de agar son transparentes, duros y quebradizos. Esta propiedad los diferencia de los otros geles de poliglúcidos, que son más elásticos y pegajosos. Además, el agar tiene la propiedad particular de presentar una gran histéresis térmica</p> <p>El llamado <i>Gelzan (Gellan Gum)</i> se produce por medio de una biorreacción y es un sustituto de agar. Puede soportar temperaturas más altas en comparación con el agar convencional. Tiene un mayor rendimiento que el agar ya que es posible generar un gel estructuralmente fuerte con una menor cantidad de producto</p>

2.8.2. Explante

El éxito de la inducción y el establecimiento del cultivo de callos depende en gran medida del *explante* usado que, a su vez, obedece a la condición de la planta madre (genotipo, estado fisiológico, posición del tejido dentro de la planta, estacionalidad, etc.).

El *explante* es una porción del tejido, órgano o células de las que se inicia un cultivo *in vitro* vegetal. Las plantas jóvenes o en desarrollo que contengan tejidos meristemáticos y crecimiento vegetativo vigoroso son la mejor fuente de *explantes*. Aunque en una misma planta se puedan encontrar, tanto crecimiento juvenil como adulto, el primero se caracteriza por ser activo y por la ausencia de estructuras reproductoras, mientras que el adulto es más lento y presenta estructuras sexuales para la reproducción de la planta, además de que pueden haber acumulado mayor cantidad de microorganismos en sus tejidos y contener menor cantidad células meristemáticas (Calva-Calva et al., 2005).

Las células meristemáticas se distinguen de otras células por su tamaño relativamente pequeño, citoplasma denso, forma isodiamétrica, pared celular delgada, mínima vacuolación y un gran núcleo. En los cultivos *in vitro* este tipo de células se encuentran en la periferia de los callos o en las suspensiones como masas o nódulos de tejidos pre-embriogénicos, lo que produce una gran variabilidad en la expresión genética entre la población celular de esos cultivos (Doerner, 2000).

2.8.3. Condiciones de preparación de medios de cultivo

El cultivo *in vitro* debe realizarse en condiciones asépticas; por lo tanto, debe ser esterilizado, por medio de calor húmedo en autoclave, aunque también puede ser filtrado. Así mismo la parte de la planta a utilizar, el *explante*, debe ser sometido a una desinfección superficial mediante el uso de diferentes soluciones desinfectantes como hipoclorito de sodio, etanol, plata coloidal, detergentes no iónicos, fungicidas,

etc. Finalmente, la siembra (colocación del *explante* en el medio de cultivo) se lleva a cabo bajo condiciones asépticas, usualmente utilizando una campana de flujo laminar (Morales-Rubio et al., 2016).

2.8.4. Condiciones de incubación

El cultivo se incuba bajo condiciones ambientales de luz, temperatura, intercambio gaseoso y humedad, controladas, que junto con las fisicoquímicas y nutricionales conducen el desarrollo del *explante* a través de sus procesos morfológicos.

Para el correcto crecimiento y desarrollo del tejido en cultivos es necesario el suministro de luz a intensidades bajas, mucho más que la de la luz solar. La acumulación en las plantas de la energía de los carbohidratos provendrá de los glúcidos agregados al medio, más que de la fotosíntesis, de manera que son innecesarios altos niveles de luz. La temperatura controlada también estabiliza el crecimiento y mejora la predictibilidad del desarrollo de los tejidos. La temperatura óptima se encuentre entre 25 y 28°C, el pH entre 5.2 y 6.5 y la luz de 0 a 12,000 lux (Calva-Calva et al., 2005).

2.8.5. Evaluación del crecimiento de los cultivos celulares

Hay numerosos métodos para determinar el crecimiento de los cultivos celulares, dependiendo de su estado morfológico y el estado de su medio de soporte (líquido, sólido y semisólido), los más utilizados son (Street, 1977):

- Número de células: Parámetro de crecimiento el cual es utilizado como un método de medición que requiere disgregar los grupos celulares en células individuales. El conteo posterior se puede realizar en una cámara de Neubauer, realizando las observaciones en un microscopio óptico.
- Volumen celular: En este método se requiere tomar un volumen conocido de la suspensión y se centrifuga durante 3 min a 200xg para provocar una

sedimentación de las células; posteriormente, se determina el volumen de éstas y se expresa en mL de células por mL de cultivo.

- Masa¹ fresca: Sobre un papel filtro previamente pesado se colocan las células lavadas con agua destilada y se pesan.
- Masa seca: Se determina de manera similar a la de la masa fresca, pero antes de pesar las células se secan a 60°C, durante 12 h como mínimo.
- Cinética de crecimiento: Permite describir el comportamiento de un cultivo celular mediante la masa fresca o la masa seca. Consiste en obtener una gráfica de variación de la masa en función del tiempo, la cual da origen a una curva sigmoidea o semi-sigmoidea que representa el crecimiento celular (Figura 2.4).

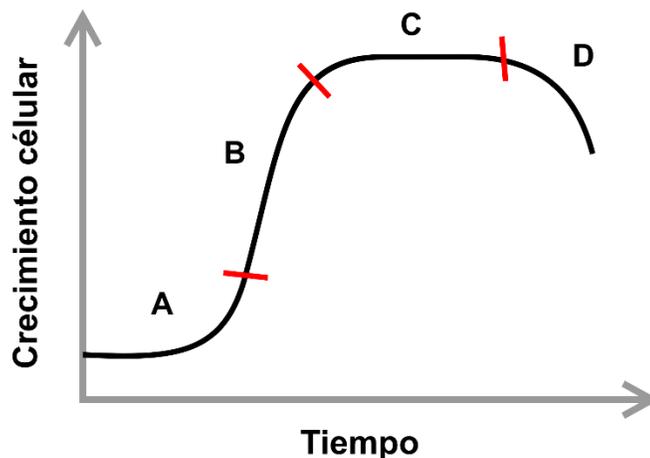


Figura 2.4. Curva de crecimiento típica: A) Fase lag, B) Fase exponencial, C) Fase estacionaria, D) Fase de muerte (Imagen de la autora)

En las curvas de crecimiento se pueden encontrar 4 fases características (Osorio-García, 2018):

¹ La masa y el peso NO son sinónimos. La masa es una propiedad de los cuerpos y siempre es constante. Se mide en kg. El peso es una fuerza que se aplica a los cuerpos y varía dependiendo de cuál sea su origen. Se mide en Newtons (Nota de la asesora)

- Fase *lag* o fase de adaptación: El comportamiento inicial depende de las condiciones de las células del inóculo, de las cuales depende también el éxito del nuevo cultivo. El objetivo de esta fase es preparar a las células para el proceso de división celular
- Fase exponencial: durante este periodo la velocidad de crecimiento adquiere su valor máximo y, en vista de la falta de factores limitantes, permanece aproximadamente constante. Por este motivo, la concentración celular aumenta rápidamente
- Fase estacionaria: durante esta fase las condiciones de cultivo son limitantes y la natalidad es igual a la mortalidad, por lo cual la concentración celular y los componentes de la biomasa permanecen sin cambios relevantes. Este comportamiento se debe a la baja concentración de algún nutriente esencial o al alto valor del pH, con consiguiente poca disponibilidad de sustrato fotosintético, o a una excesiva concentración de oxígeno, aunque con frecuencia el motivo más importante es la pobre penetración de la luz causada por la alta concentración celular (efecto de auto sombreado)
- Fase de muerte: la tasa de mortalidad es superior a la de natalidad, por lo cual la concentración disminuye. Además, se registra una disminución de la biomasa unitaria como resultado de un incremento en la proporción entre respiración y fotosíntesis y a la ausencia de nutrientes, que conlleva a la muerte o lisis celular (concentración, recuento celular, etc.).

2.9. Modelo biológico: *Phragmites australis*

El carrizo (*Phragmites australis*) es una especie de caña de la familia *Poaceae* (Tabla 2.2). *Phragmites australis* fue descrita primero por Antonio José de Cavanilles como *Arundo australis* y posteriormente desplazado al género *Phragmites* por Carl Bernhard von Trinius y publicado en *Ernst Gottlieb von Steudel, Nomenclator Botanicus Editio secunda, vol. 1* en el año 1840 (Figura 2.5). Su etimología se compone de *Phragmites*, nombre genérico que deriva del griego *phragma* que

significa cerca o valla, por su forma de crecer a lo largo de los ríos, y *australis*: epíteto latino que significa "del sur" (Colaboradores de Wikipedia (2), 2022).



Figura 2.5. *Phragmites australis* (cortesía de Oswaldo Téllez-Valdés, CONABIO, 2009)

Tabla 2.2. Taxonomía de *Phragmites australis* (Parker, 2008)

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Liliopsida</i>
Orden	<i>Poales</i>
Familia	<i>Poaceae</i>
Subfamilia	<i>Arundinoideae</i>
Tribu	<i>Arundineae</i>
Género	<i>Phragmites</i>
Especie	<i>Phragmites australis</i>

Es una planta perenne, con un rizoma rastrero con capacidad para crecer en la superficie buscando agua. Puede alcanzar los 4 m de altura y 3 cm de diámetro, presentando una gran inflorescencia al final del tallo.

Tiene una distribución cosmopolita y subcosmopolita. Habita generalmente en suelos húmedos y orillas de cursos de agua y lagunas. En ríos se encuentran fundamentalmente en los tramos más bajos, en los que la velocidad del curso de agua les permite enraizar. Puede soportar bastante bien niveles moderados de salinidad en el agua y en el suelo, necesitando suelos encharcados hasta profundidades de 50 cm, por lo que es posible encontrarlo en las proximidades de marismas y zonas más salobres (Colaboradores de Wikipedia (2), 2022).

Capítulo 3

Materiales y métodos

El presente trabajo se llevó a cabo en los Laboratorios de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental del Edificio E-3 Alimentos y Química Ambiental y en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Bioquímica del Edificio E-1 de Bioquímica y Farmacia, ubicados en el Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM (Figura 3.1).



Figura 3.1. Localización de los LIQAYQA (Edificio E-3 Alimentos y Química Ambiental) y el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (Edificio E-1 Bioquímica y Farmacia) en el Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM

El material biológico *Phragmites australis* fue obtenido del humedal artificial localizado dentro de las instalaciones del Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel Sur (CCH-Sur) de la UNAM (Figura 3.2), donde los Laboratorios de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental en un proyecto conjunto con colegas del CCH Sur aprovecharon dos proyectos INFOCAB para construir este humedal artificial prototipo para apoyar la docencia experimental y ejemplificar la bondad del sistema. El área donde está ubicado forma parte de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA), que se encuentra al suroeste de la Ciudad de México, en los terrenos de la Ciudad Universitaria, por lo que es custodiada y manejada por la Universidad Nacional Autónoma de México (Palacios-Vargas et al., 2009).

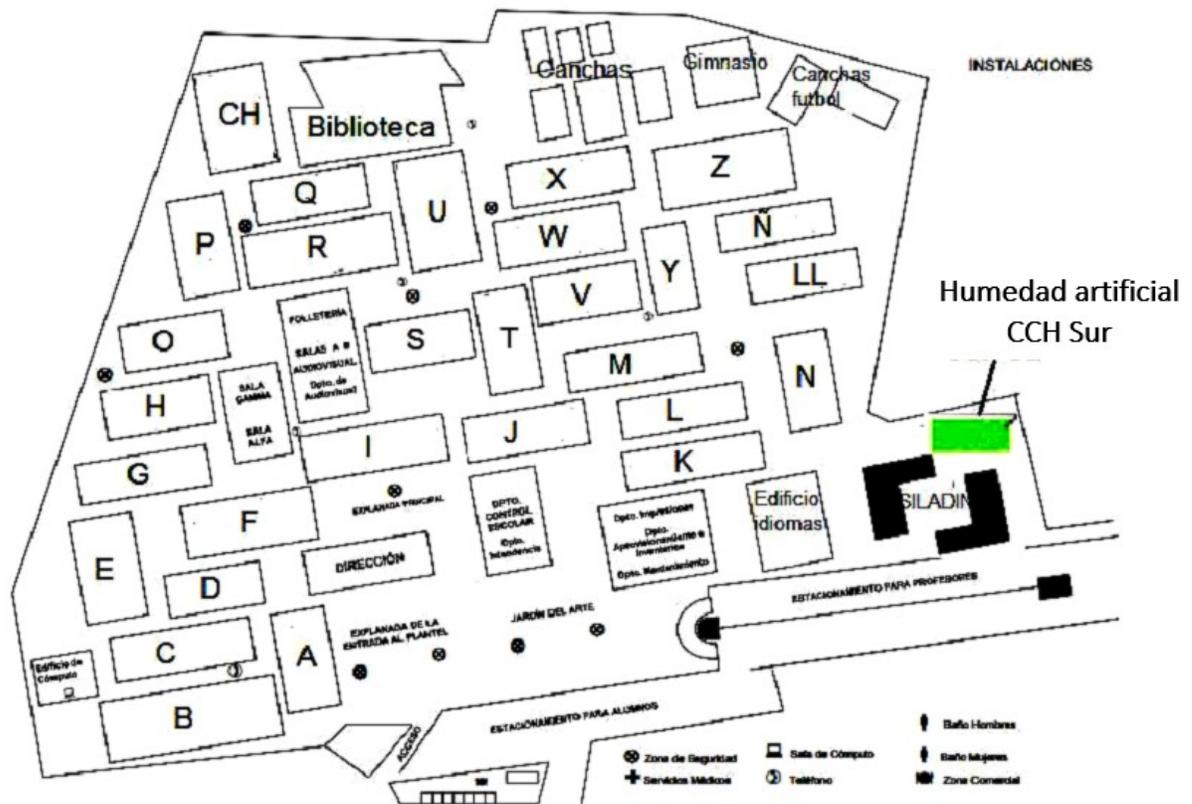


Figura 3.2. Localización del humedal artificial (CCH-Sur, 2014)

El desarrollo de la metodología se llevó a cabo de manera acumulativa desde el inicio de la investigación hasta el final del experimento debido al requerimiento constante del material biológico para los procesos. Por lo tanto, se dio mantenimiento continuo a cada uno de los sistemas establecidos a lo largo de la investigación para satisfacer la demanda.

Siendo así, aunque la metodología en esta tesis se describe como una secuencia de pasos a seguir para facilitar su comprensión, se aclara que el inicio de cada etapa consecuente no amerita el final de la anterior, implicando una continuidad para el desarrollo de las etapas.

La metodología se llevó a cabo en cinco etapas:

Etapa 1: Obtención de plantas donadoras de *explantes*.

Etapa 2: Establecimiento de cultivos *in vitro* de callos.

Etapa 3: Caracterización de cultivo para determinar cinética de crecimiento.

Etapa 4: Evaluación de la toxicidad del cadmio sobre el crecimiento de callos.

Etapa 5: Regeneración de planta a partir de los callos.

Para el cumplimiento las etapas de la parte experimental se llevaron a cabo como se presenta en el diagrama (Figura 3.3).

3.1. Etapa I. Obtención de plantas donadoras de explantes

Se extrajeron del humedal artificial de Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel Sur 8 plantas de carrizo (*Phragmites australis*) (Figura 3.4) para establecer cultivos en reactores a escala de laboratorio a partir de plantas sanas (Figura 3.5).

Cada reactor se construyó cortando 38 cm de largo de tubo de cloruro de polivinilo, PVC en inglés, de 20 cm (8 pulgadas) de diámetro y empalmándolo con su

respectiva base, sellando cada una de las uniones con cemento azul para PVC de la marca “Omega”, para evitar fugas.

A cada reactor se le añadió tezontle, roca volcánica muy porosa, de tamaño homogéneo (1 cm de diámetro equivalente) como soporte para la planta, que previamente se lavó con el fin de disminuir la carga microbiana y materia orgánica que pudiera contener.

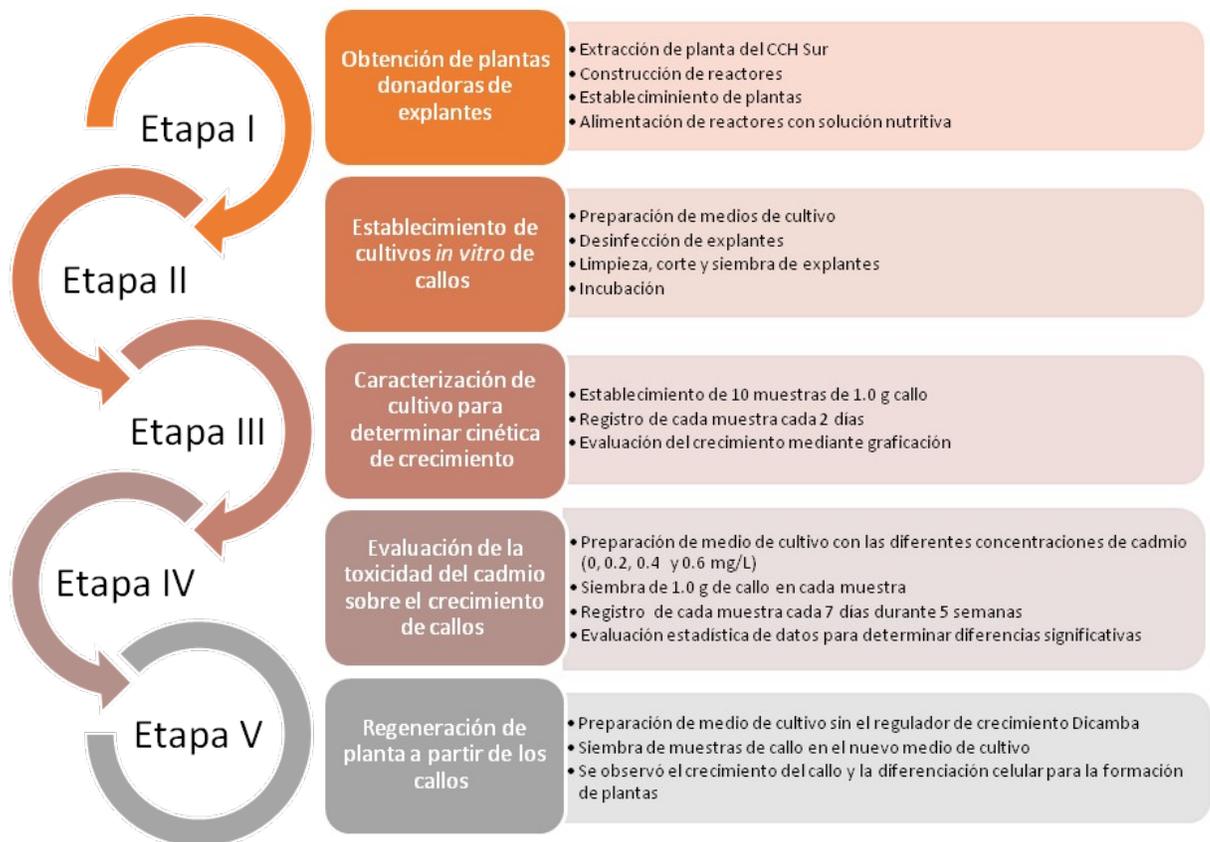


Figura 3.3. Metodología general

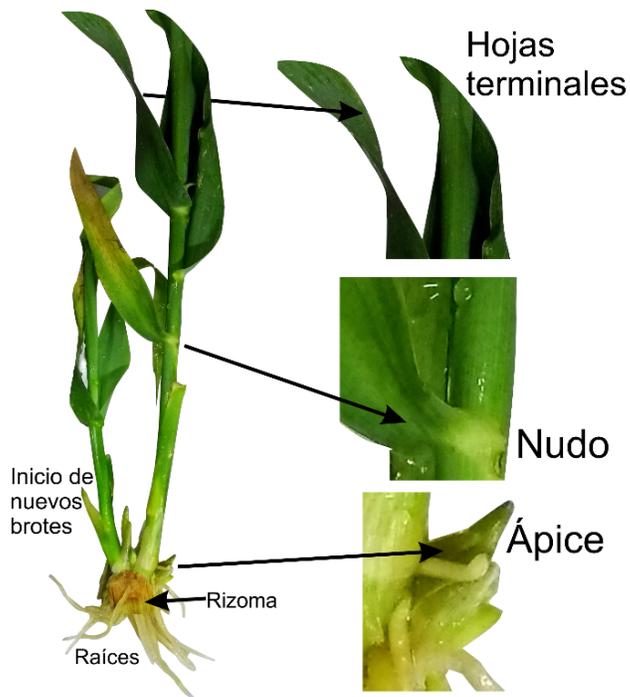


Figura 3.4. Partes de la planta *Phragmites australis* de las cuales se extrajeron los *explantes*



Figura 3.5. Reactor de PVC para el crecimiento de las plantas acuáticas

(Fotografías de la autora)

Cada planta se instaló 15 cm por encima de la base de la base del reactor y se cubrió con 15 cm más de tezontle de las mismas dimensiones e igualmente lavado (Figura 3.5). Semanalmente se alimentó cada reactor con solución nutritiva (Tabla 3.1) para promover su crecimiento, drenando la solución anterior con el fin de disminuir en lo mayor posible la carga microbiana.

3.2. Etapa II. Establecimiento de cultivos *in vitro* de callos

3.2.1. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron cuatro en total, descritos en la Tabla 3.2.

Tabla 3.1. Preparación de la solución nutritiva

Reactivos	Concentración (mg/L)	Reactivos	Concentración (mg/L)
NH ₄ H ₂ PO ₄	23.62	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.050
MgSO ₄ .7H ₂ O	98.79	H ₃ BO ₃	0.19
KCl	223.09	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.12
NaNO ₃	252.09	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ H ₂ O	1.52
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.10	FeSO ₄ .7H ₂ O	5.61
CaCl ₂	115.61		

Tabla 3.2. Composición de los medios de cultivo (se resaltan en negritas el compuesto y composición diferente con respecto del medio de cultivo, MC, anterior)

Compuesto	Nombre y concentración de cada medio de cultivo			
	MC1	MC2	MC3	MC4
Sales inorgánicas	MS ¹ 100%			B5 ² 100%
Vitaminas MS modificadas	100%			
Aminoácido	Glicina 2 mg/L			
Fuente de energía	Sacarosa 30 g/L			
Fitohormona para inducción de callo (auxina)	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 1.0 mg/L			<i>Dicamba</i> 5.0 mg/L
Auxina	ANA 1.0 mg/L			
Citocina	BA 0.5 mg			
pH	5.7			
Gelificante	Gelzan 3.3 g/L		Gelzan 3.0 g/L	
Antibiótico	Cefotaxime 1.0 mL/L			
Antimicótico	Nistatina 50.0 mg/L			

Donde MS: Medio de sales y vitaminas (Murashige y Skoog, 1962); B5: Sales para la preparación de medio de Gamborg (Gamborg et al, 1968); *Dicamba*: Herbicida selectivo con actividad de auxina en bajas concentraciones; ANA: Ácido naftalenacético; BA: Bencil amino purina 1,2: Anexo A-3. Composición de sales para preparación de medios de cultivo

Para promover el desarrollo de callo se probaron los medios de cultivo MC1 y MC2, con base en los requerimientos esenciales de la planta. Conforme se indujo el crecimiento del callo, se hicieron observaciones en el desarrollo y se eligió preservar los callos solamente en medio MC2, debido a que el crecimiento era mayor que con MC1. Posteriormente, al observar que los callos se resecaban se disminuyó el agente gelificante del medio para aumentar la disponibilidad de agua al tejido vegetal, siendo el medio de cultivo MC3 al que se le redujo la cantidad de agente gelificante. Simultáneamente, se realizó mayor investigación técnica del crecimiento de callo y se probó una modificación adicional de la auxina inductora de callo y las sales inorgánicas, la cual resultó en el medio de cultivo MC4, que fue el más conveniente ya que mejoró el crecimiento del callo con respecto del MC2.

Los medios de cultivo se sirvieron en frascos con dimensiones de 6 cm de diámetro por 5 cm de altura con un volumen de 20 mL.

3.2.2. Métodos de desinfección

Para establecer los medios *in vitro* se extrajeron *explantes* de 3 diferentes tejidos de la planta: Las hojas terminales, los nudos y los ápices como se muestra en la Figura 3.4 ya señalada antes. Al elegir las plantas de los reactores se seleccionaron los mejores tallos, en cuanto a su apariencia y su vigor, que no presentaran afecciones con hongos ni otra infección bacteriana o viral, así como tejido dañado por insectos. Posteriormente, los *explantes* se dividieron a la mitad y se sometió cada parte a uno de los dos métodos de desinfección, D1 y D2, descritos en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Métodos de desinfección probados para el establecimiento de los cultivos *in vitro* de *Phragmites australis*

Método	Componente	Concentración	Acción	Tiempo	Condición de espacio
	Jabón líquido y agua corriente	10 mL/L	Sumergir y agitar	15 minutos	Aséptica

Método	Componente	Concentración	Acción	Tiempo	Condición de espacio
D1	Alcohol	70%	Sumergir y agitar	1 minuto	Estéril Realizar en campana de flujo laminar
	Hipoclorito de sodio	10%	Sumergir y agitar	20 minutos	
	Agua desionizada estéril	100%	Enjuagar 3 veces	1 minuto c/u	
	Benomil	2 g/L	Sumergir y agitar	15 minutos	
	Agua desionizada estéril	100%	Enjuagar 3 veces	1 minuto c/u	
	Agrimicin-500	2 g/L	Sumergir y agitar	15 minutos	
	Agua desionizada estéril	100%	Enjuagar 3 veces	1 minuto c/u	
	Antioxidante (Ácidos ascórbico y cítrico)	100 g/L c/u	Sumergir y	15 minutos	
	Antibiótico y antimicótico, mg/L	Cefotaxime 250 Terbinafina 250	agitar		
D2	Jabón líquido y agua corriente	10 mL/L	Sumergir y agitar	15 minutos	Aséptica
	Alcohol	70%	Sumergir y agitar	1 minuto	Realizar en campana de flujo laminar
	Hipoclorito de sodio	20%	Sumergir y agitar	20 minutos	
	Agua desionizada estéril	100%	Enjuagar 3 veces	1 minuto cada uno	
	Benomil	2 g/L	Sumergir y agitar		
	Agua desionizada estéril	100%	Enjuagar 3 veces	1 minuto c/u	
	Agrimicin-500	2 g/L	Sumergir y agitar		
	Agua desionizada	100%	Enjuagar 3	1 minuto c/u	

Método	Componente	Concentración	Acción	Tiempo	Condición de espacio
	estéril		veces		
	Antioxidante (Ácidos ascórbico y cítrico)	100 g/L c/u	Sumergir	15 minutos	
	Antibiótico y antimicótico, mg/L	Cefotaxime 250 Terbinafina 250	y agitar		

3.2.3. Limpieza, corte y siembra de *explantes*

Una vez desinfectados los *explantes*, en condiciones de esterilidad, se les retiró el tejido exterior dañado durante la desinfección y se les realizaron cortes específicos a cada tipo de tejido para, posteriormente, colocarlos en los medios de cultivo enriquecidos para inducir el desarrollo de callo.

Se colocaron 6 *explantes* en cada uno de los 20 medios cultivo de MC1 y MC2, siendo la mitad de cada tipo. Posteriormente, los cultivos se ubicaron bajo condiciones ambientales controladas en un cuarto de incubación a 25°C, con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

3.2.4. Incubación

El procedimiento para la inducción de callos se realizó 4 veces en total (selección, corte, desinfección y siembra). Solamente en el primer procedimiento se realizaron los métodos de desinfección D1 y D2. Para las siguientes se utilizó solamente el método de desinfección D2 para todos los *explantes*. Se sembraron los *explantes* las primeras dos ocasiones en medios de cultivo MC1 y MC2; la tercera vez solamente en medio MC2 y la última vez en medio MC4.

De los cultivos con los cuales se logró la inducción de callo se cambió a medio de cultivo nuevo cada 6 semanas y simultáneamente se les retiraba, en condiciones de esterilidad, el tejido deteriorado u oxidado que tuvieran, manteniendo solamente el callo fresco y el tejido vegetal que no hubiese perecido.

El medio MC3 se utilizó para los cambios de medio de cultivo nuevo a partir del tercer procedimiento de inducción de callo, en el que se disminuyó la cantidad de agente gelificante con el objetivo de tener mayor cantidad agua disponible para el callo y evitar su deshidratación.

Todos los callos obtenidos se mantuvieron al final solamente en medio MC4, dado que se encontró que fue más benéfico para su proliferación.

3.3. Etapa III. Caracterización de cultivo para determinar su cinética de crecimiento

3.3.1. Establecimiento de muestras de callo

A partir de los callos caracterizados se hizo una mezcla de estos con el fin de homogeneizar el tejido y evitar tomar muestras que derivaran en resultados sesgados. Se sirvieron 10 frascos de 3.5 cm de diámetro por 3 cm de altura con 10 mL de medio de cultivo MC4 y se les colocó un gramo de callo tomado de la mezcla. Se sometieron bajo condiciones ambientales controladas en un cuarto de incubación a 25°C, con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

3.3.2. Registro de la masa de cada muestra

Se midió y registró la masa del callo de cada muestra cada 2 días, tres veces a la semana, durante 3 semanas consecutivas. Teniendo un total de 10 mediciones para cada una de las 10 repeticiones.

3.3.3. Evaluación del crecimiento mediante su masa

Con los datos obtenidos se calculó el promedio de masa de cada día y se graficó para visualizar la cinética de crecimiento y determinar las fases *lag*, exponencial y estacionaria.

3.4. Etapa IV. Evaluación de la toxicidad del cadmio sobre el crecimiento de callos

3.4.1. Preparación del medio de cultivo con cadmio

Se preparó medio de cultivo MC4 al cual se le añadieron diferentes volúmenes de una solución de cadmio con una concentración de 10.0 mg/L (Tabla 3.4) preparada a partir de la solución patrón trazable de material de referencia estándar del Instituto Estadounidense de Normas y Tecnología para $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 0.5 mol/L (1000 mg/L Cd Certipur®) para obtener 5 medios de cultivo a cada una de las cuatro concentraciones de 0, 0.2, 0.4 y 0.6 mg/L Cd (cinco repeticiones de tres concentraciones y un blanco, 20 muestras en total). Estas concentraciones hacen referencia a la concentración de cadmio determinada en el agua de mina, que oscila entre 0.2 a 0.5 mg/L (Ruiz-López, 2009). Se vertieron 10 mL de medio de cultivo con las diferentes concentraciones de cadmio en 5 frascos de cinética de crecimiento con capacidad de 30 mL, teniendo un total de 20 frascos con medio.

Tabla 3.4. Volumen de solución de cadmio, 10.0 mg/L, añadida para cada concentración de cadmio en los medios de cultivo

Concentración de cadmio	Volumen solución 10.0 mg/L de cadmio	Volumen total de medio de cultivo
0 mg/L	0 mL	300 mL
0.2 mg/L	6 mL	300 mL
0.4 mg/L	1.2 mL	300 mL
0.6 mg/L	1.8 mL	300 mL

3.4.2. Selección y siembra de callo

Una vez conocida la cinética de crecimiento de los callos de *Phragmites australis*, se establecieron cultivos de callo a partir de los cuales se tomaron las muestras para el ensayo en el día 9 a partir del día de siembra, siendo este el momento en el que se inició el periodo exponencial.

Se colocó 1.0 g de callo en cada uno de los frascos con medio de cultivo, se sometieron a condiciones ambientales controladas en un cuarto de incubación a 25°C, con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

3.4.3. Registro de la masa de cada muestra

Se midieron y registraron las masas de callo de cada 7 días, durante 5 semanas consecutivas. Se tuvo un total de 6 mediciones (considerando el día 0) para cada una de las 5 repeticiones de las concentraciones de cadmio (tres y un blanco).

3.4.4. Evaluación estadística de datos

Se evaluó el efecto de toxicidad realizando un análisis estadístico para comparar simultáneamente si existían diferencias en el crecimiento de los callos a las 4 diferentes concentraciones en estudio, un blanco y tres de cadmio.

3.5. Etapa V. Regeneración de las plantas a partir de los callos

Se preparó nuevo medio de cultivo MC4 sin agregarle el regulador de crecimiento *dicamba* y se sembraron en diferentes frascos callos de *Phragmites australis*.

Se realizaron 4 subcultivos al mismo medio sin regulador de crecimiento y al momento de obtenerse plántulas se pasaron a un medio MS (sales y vitaminas MS, Murashige y Skoog, 1962) líquido sin regulador de crecimiento.

Capítulo 4

Resultados y discusión

4.1. Etapa 1. Obtención de plantas donadoras de *explantes*

Se obtuvieron las plantas sanas de carrizo y se establecieron los reactores para su crecimiento satisfactoriamente. Se observó que las plantas de carrizo tuvieron un crecimiento óptimo al ser alimentados los reactores con la solución nutritiva preparada.

4.2. Etapa 2. Establecimiento de cultivos *in vitro* de callos

4.2.1. Métodos de desinfección

Dado que en el procedimiento P1 se obtuvo menor cantidad de medios contaminados (Ver Tabla 4.1) utilizando el método de desinfección D2. Se decidió utilizarlo para los siguientes procedimientos y descartar el uso de D1.

Tabla 4.1. Procedimiento P1: Medios de cultivo sembrados con explantes desinfectados con los métodos de D1 y D2

Medios de cultivo	Desinfectados con D1	Desinfectados con D2	Totales	Contaminados con D1, %	Contaminados con D2, %
M1	5	5	10	60	20
M2	5	5	10	40	0
Total	10	10	20	50	10

4.2.2. Medios de cultivo con diferentes concentraciones de 2,4-D

Se probaron inicialmente los medios de cultivo M1 y M2, resultando con mayor inducción el M2 (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Callo inducido en los procedimientos P1 y P2 utilizando los medios de cultivo M1 y M2

Procedimiento	Tipo de medio	Cultivos con desarrollo de callo, %
P1	M1	50.0
	M2	62.5
P2	M1	37.5
	M2	71.4%

4.2.3. Incubación y obtención del callo

Se consiguió inducir el crecimiento de callo a partir de los diferentes *explantes* de carrizo expuestos al medio enriquecido y las condiciones de incubación de temperatura constante de 25°C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

4.3. Etapa 3. Caracterización de cultivos para determinar cinética de crecimiento.

Se realizó el registro de masa de callo para determinar el comportamiento de crecimiento del callo con medio MC4 y determinar las fases de éste. Los resultados se muestran en la Tabla A-1.1 del Anexo A-1. Gráficamente, con estos se obtiene la curva de crecimiento (Figura 4.1).

Se presenta la masa promedio por día de callo de *Phragmites australis* y se señalan las fases de desarrollo alcanzadas en el ensayo. En la gráfica se observa que la fase

lag duró a partir del inicio de la incubación hasta el día 9, y la fase exponencial inició en el día 10 y no se determinó el día final de la fase debido a que en la gráfica se observa que el crecimiento continúa aún en la última muestra registrada. Para conocer el tiempo total que dura la fase exponencial se tendría que extender el tiempo de incubación y los registros de masa del callo para determinar la cinética de crecimiento completa.

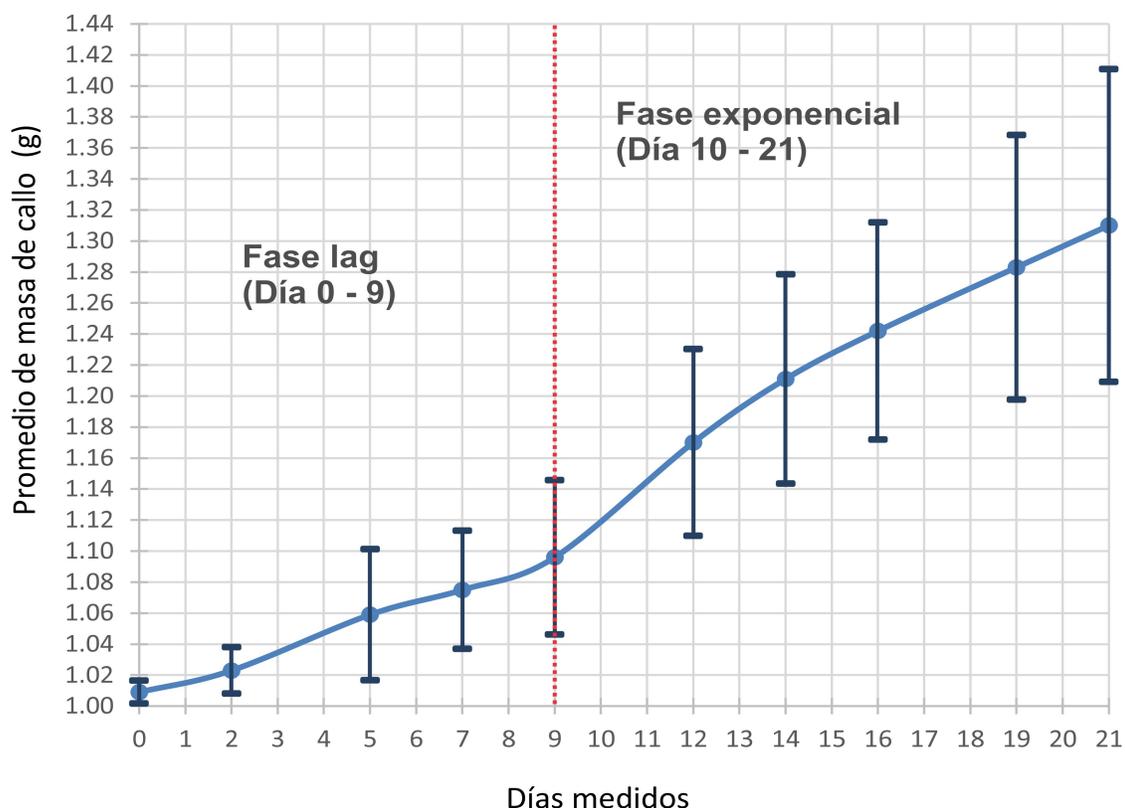


Figura 4.1. Cinética de crecimiento de los callos

4.4. Etapa 4. Evaluación de la toxicidad del cadmio sobre el crecimiento de los callos

Se muestra el promedio de las repeticiones por semana para cada concentración considerada, en la Tabla A-1.2 del Anexo A-1 (Figura 4.2).

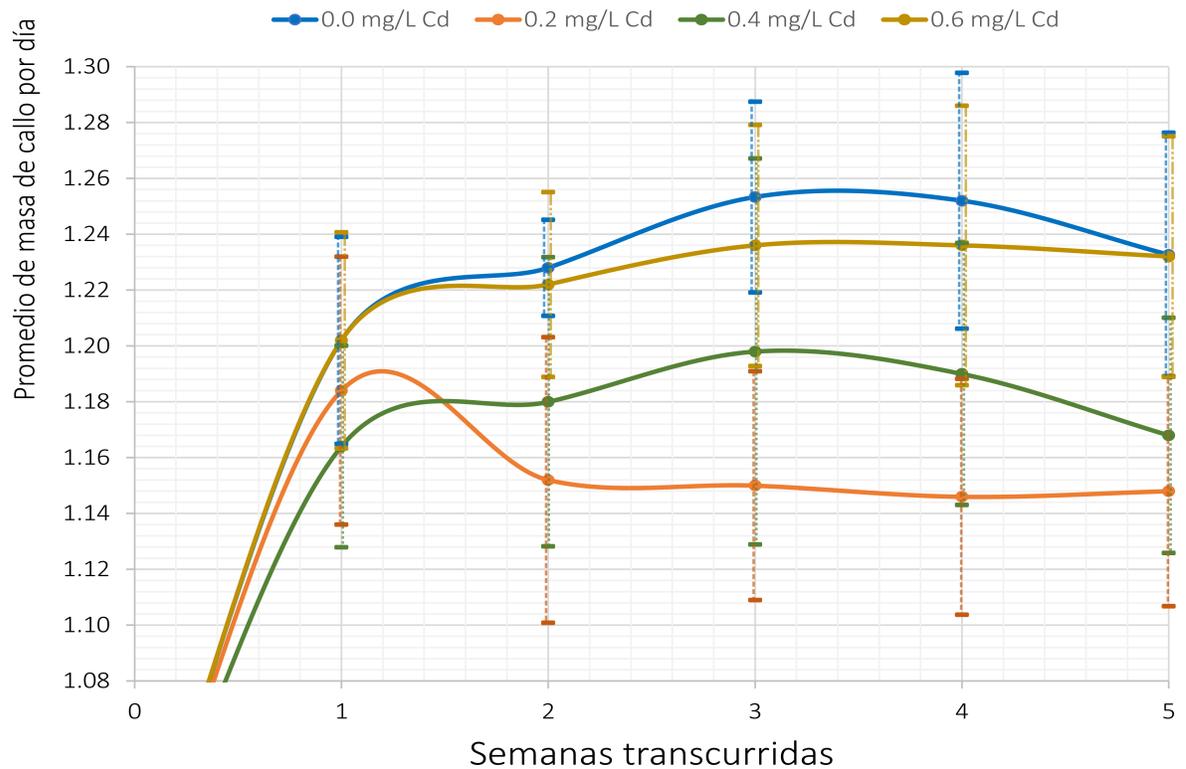


Figura 4.2. Crecimiento promedio de callo para cada concentración de cadmio

4.4.1. Análisis estadístico del crecimiento de callo expuesto

Se realizó el análisis estadístico sobre los datos del diseño completamente aleatorizado con 4 tratamientos, correspondientes a las diferentes concentraciones de cadmio.

Modelo

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$$i = 1, 2, \dots, a$$

$$j = 1, 2, \dots, b$$

Hipótesis nula (H_0): $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu$

Hipótesis alterna (H_A): $\mu_i \neq \mu_{ai} \neq a$

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medio (varianza)	F calculada	F teórica
Tratamientos	$SCT = \sum_{i=1}^a \frac{Y_i^2}{b_i} - \frac{Y^2}{N}$	$a-1$	$CMt = \frac{SCT}{a-1}$	$F_0 = \frac{CMt}{CMe}$	F_1 $= F_{(1-\alpha, a-1, N-a)}$
Error	$SCe = SCT - SCT$	$N-a$	$CMe = \frac{SCe}{N-a}$		
Total	$SCT = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2 - \frac{Y^2}{N}$	$N-1$			

Y_i = Suma de las observaciones de i-ésimo tratamiento

$$Y_{..} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij} = \sum_{i=1}^a Y_i.$$

$N = ab$

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medio (varianza)	F calculada	F teórica
Tratamientos	$SCT = 0.01$	3	$CMt = 0.0033$	$F_0 = 0.5077$	$F_1 = F_{(0.95, 3, 20)}$ $= 3.10$
Error	$SCe = 0.14 - 0.01 = 0.13$	20	$CMe = 0.0065$		
Total	$SCT = 0.14$	23			

Dado que $F_0 < F_1$, se aprueba la hipótesis nula, por lo tanto, no hay diferencia significativa en el crecimiento del callo expuesto a las diferentes concentraciones de cadmio en el medio.

4.5. Etapa 5: Regeneración de planta a partir de los callos

Se logró germinar los embriones somáticos a partir del callo de *Phragmites australis* obtenido y mantenido durante 1 año, quitando el inductor de embriogénesis somática *dicamba*.

En la Figura 4.3 se presentan los callos mantenidos durante 1 año. En la Figura 4.3a se pueden observar pequeñas protuberancias que son embriones somáticos mientras que en la Figura 4.3b, cuando se les quitó el *dicamba*, se corroboró la germinación de los embriones. En ella ya se presentan raíces pivotantes así como pequeñas hojas lo que demuestra un origen embriogénico.

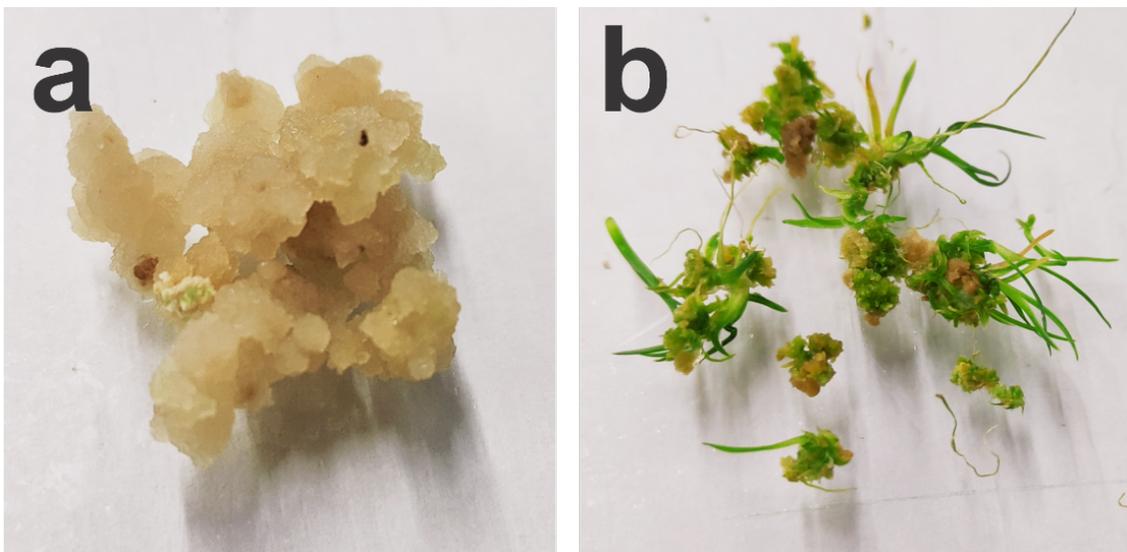


Figura 4.3. Estadios de diferenciación de callo a planta de *Phragmites australis*. (a): callo embriogénico. (b): Germinación de embriones somáticos híbridos de callo con hojas y raíces en direcciones no definidas

En la Figura 4.4, se observan las plántulas (4.5c) y plantas de carrizo (4.5d) que presenta un desarrollo normal tanto de raíces como parte aérea lo que permite una mejor adaptación de acondicionamiento *ex vitro*. En las plántulas de carrizo (4.5c) se

presenta una zona nodular con extensión de hojas y raíces creciendo en una dirección definida y en (4.5d) se tiene ya la planta desarrollada con hojas y raíces largas.

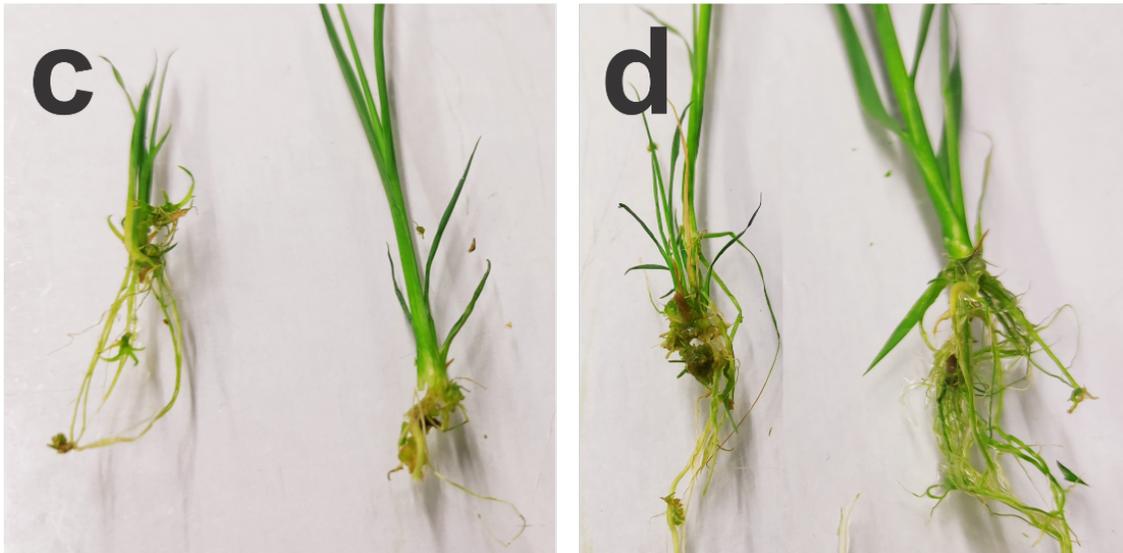


Figura 4.4. Acercamiento de las plántulas y plantas de carrizo

En la Figura 4.5 se observa toda la secuencia que se obtuvo durante la germinación y desarrollo de las plántulas de carrizo partiendo de callos embriogénicos: a) callos embriogénicos, b) germinación de embriones c) plántulas de carrizo d) plantas completas ya crecidas y mantenidas en medio líquido.

4.6. Análisis final

La instalación de los reactores con plantas de carrizo fue óptima y se logró una adecuada adaptación de las plantas a su nuevo ecosistema, diferente en sustrato y clima. Las plantas crecieron lo suficiente para que se tomaran repetidas muestras sanas de tallos, hojas y nodos. El cambio periódico del agua de riego favoreció la disminución de carga microbiana, debido a que esto previene la acumulación por el

estancamiento. Posteriormente, se llevó a cabo la desinfección, la cual resultó ser un proceso laborioso debido a que las plantas provenían de un sustrato de tierra expuesto al aire libre, por lo que a pesar del cambio de sustrato y la renovación constante de agua de riego para disminuir la carga microbiana, se requirió implementar un método de desinfección.



Figura 4.5. Seguimiento fotográfico: a) Callos embriogénicos, b) Germinación de embriones c) Plántulas de carrizo, d) Plantas completas crecidas y mantenidas en medio líquido

Los desinfectantes son sustancias químicas capaces de destruir microorganismos; sin embargo, dada su alta toxicidad deben de ser probadas las concentraciones óptimas de uso en organismos vivos, siendo en este caso de tejidos vegetales, con el fin de mantener la viabilidad celular. Para eliminar las bacterias y hongos, principales contaminantes más frecuentes en el cultivo *in vitro* (Alvarado, 1988), se probaron dos métodos que incluyen diversos antisépticos, fungicidas, bactericidas (ANEXO modo de acción de los antisépticos), y cantidades distintas de hipoclorito de sodio, que actúa como disolvente de ácidos grasos de los microorganismos y oxidante de sus

estructuras (Hernández-Navarrete et al., 2014). Se determinó que el método D2 es más efectivo para la desinfección de los cortes de carrizo dado que los cultivos establecidos con *explantes* sometidos a este método presentaron menor porcentaje de medios contaminados, siendo 50% medios contaminados con el método D1 y solamente el 10% con el D2. Se explica este resultado a causa de que el método D2 implica el uso de mayor concentración de hipoclorito de sodio que el D1 y, a su vez, se determinó que tal concentración aparentemente no dañó el tejido de la planta ni resultó perjudicial para el desarrollo del callo.

El crecimiento celular *in vitro* es un proceso controlado por las interacciones que se establecen entre los medios nutritivos suplementados con reguladores de crecimiento, así como las condiciones fisiológicas y bioquímicas endógenas de los *explantes*. En contraste con el desarrollo de una planta completa, la inducción de callo tiene requerimientos particulares, siendo el principal el regulador de crecimiento, que promueve la dediferenciación celular a partir de los *explantes* expuestos al medio de cultivo enriquecido (Ramos-Rodríguez, 2006). En los dos procedimientos de siembra de *explantes* en los que se probaron los medios de cultivo con diferentes concentraciones del regulador de crecimiento 2,4-D se halló que se indujo callo en un mayor porcentaje de medios M2 que los M1. Si bien, en ambos medios se logró inducir el callo, con lo cual se cumple uno de los objetivos, tener un rendimiento mayor de callo es fundamental para darle continuidad a los ensayos dado que permite avanzar más rápido al tener una muestra mayor de callo. Tanto en los *explantes* de nodos como de hojas superiores se consiguió inducir el callo ya que presentan un gran número de células meristemáticas, las cuales tienen la singularidad de dividirse aceleradamente, aunque adicionalmente se ha demostrado que la formación de callo se puede iniciar casi a partir de cualquier órgano vegetal, ya sea hoja, tallo, raíz, nudo, pecíolo, cotiledones, etc. es por esto que la respuesta celular a la formación callo depende de muchos factores, las condiciones fisiológicas y bioquímicas de los tejidos, la composición de los medios de los cultivos y las condiciones ambientales, entre otras (Álvarez, 1994).

Conforme se desarrollaba el callo en medio M2 se observó que este presentaba un aspecto reseco con frecuencia, por lo que se disminuyó la cantidad de gelificante del medio para aumentar la disponibilidad de agua para las células. Posteriormente, a pesar de haber logrado la inducción del callo, no se había logrado obtener la cantidad suficiente de callo para realizar la cinética de crecimiento y posteriormente el ensayo de toxicidad, por ello, con el fin de mejorar el rendimiento de callo, se realizó una investigación en la literatura y se encontró un ensayo en el que la producción de callo de otra especie hidrofita (*Typha latifolia*) mejoró con una concentración de 5 mg/L de dicamba en el medio (Estime et al., 2002). Con base en esta información se establecieron 5 medios de cultivos de callo con medio M4 y se observó un crecimiento mayor respecto al callo mantenido en M3, por lo cual se decidió cambiar todo el callo a medio M4.

Teniendo callo suficiente, se procedió a realizar la curva de crecimiento en la cual se precisaron la fase *lag* y parte de la fase exponencial sin hallar el final de esta ni el principio de la fase estacionaria, lo cual deriva de la tendencia creciente de la curva en la gráfica, ya que en ninguno de los puntos se aprecia una masa constante, indicativo de la fase estacionaria. Para discernir todas las fases de cinética de crecimiento se requiere continuar las mediciones periódicamente hasta que perezca el callo en el medio, no se realizó debido a que el objetivo de la cinética de crecimiento es hallar el tiempo de inicio de la fase exponencial, primordial para realizar el muestreo del callo para el establecimiento de los medios para el ensayo de toxicidad de cadmio.

En el ensayo para probar la toxicidad del cadmio en el callo de *Phragmites australis*, se designó como indicador de crecimiento la masa de callo de cada una de las muestras expuestas al medio con cadmio medida periódicamente. Con los resultados obtenidos se realizó una gráfica para visualizar la cinética de crecimiento del callo a cada una de las concentraciones de cadmio. Se observa al comparar las curvas de crecimiento que el callo que más creció fue aquel que tenía una concentración de 0 mg/L Cd, seguido del callo a concentración de 0.6 mg/L Cd, luego a 0.4 mg/L y

finalmente el callo que menos creció fue el de concentración 0.2 mg/L; sin embargo este orden de crecimiento no parece tener relación directa con respecto a la concentración de cadmio, por lo que se realizó un análisis estadístico en el cual se confrontaron los resultados de las 4 concentraciones simultáneamente para evaluar las diferencias entre ellas; como resultado se evidenció que no hay diferencia significativa entre el crecimiento de callo a las 4 concentraciones de cadmio.

Dado que no se manifestó una diferencia en el crecimiento del callo por efecto del cadmio, se infiere que este no causa un daño tóxico a las células de *Phragmites australis*, a pesar del carácter potencialmente tóxico del elemento. Siendo así, dicha resistencia del tejido vegetal indica la existencia de al menos algún mecanismo de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos.

Se sabe que las plantas presentan una serie de mecanismos celulares que pueden estar participando en la tolerancia a elementos potencialmente tóxicos. Estos consisten en la formación de micorrizas, el secuestro del metal en la pared celular de la planta, la precipitación con exudados radicales, la reducción de la absorción del metal por la membrana plasmática, el secuestro de metales en vacuolas mediante transportadores específicos localizados en el tonoplasto y quelación de metales en el citosol por fitoquelatinas, metalotioneinas, histidina y prolina en forma libre (González-Mendoza y Zapata-Pérez, 2008). Sin embargo, la prevalencia de un mecanismo u otro en una planta no está del todo comprendido y, así mismo, se desconoce cuál o cuáles pudieran ser los mecanismos de tolerancia existentes en *Phragmites australis*, por lo que se considera necesario llevar a cabo estudios que involucren la aplicación de herramientas moleculares, con el fin de entender con claridad el modo de acción de los mecanismos de *Phragmites australis*.

Siendo que la tolerancia a EPT en los organismos vegetales puede entenderse como resultado de un proceso evolutivo dado por el desarrollo de una serie de mecanismos específicos que permiten mantener la toma de elementos esenciales dentro de intervalos fisiológicos permisibles mientras prevalece la capacidad de inactivar

metabólicamente los elementos que representan un riesgo para la integridad celular, (Linhart y Grant, 1996), se reconoce que este tipo de conocimiento permite proponer soluciones a problemas de contaminación de agua y la posibilidad de recuperación de los diferentes ecosistemas impactados por metales y otros EPT, tales como las zonas mineras.

Finalmente, a algunos callos conservados (no expuestos a cadmio) se les retiró el regulador de crecimiento dicamba del medio y a partir de los embriones somáticos presentes se logró la germinación de plantas de *Phragmites australis*.

Capítulo 5

Conclusiones y perspectivas

5.1. Conclusiones

De acuerdo con el objetivo de esta investigación que era el de evaluar el efecto del cadmio sobre el crecimiento de callo de *Phragmites australis*, a continuación, se presentan las siguientes conclusiones:

- La especie *Phragmites australis* se adaptó óptimamente en el sustrato de tezontle y nuevo clima al que fue sometido.
- La selección de las partes de las plantas de aspecto sano resultó adecuada para obtener los *explantes* y posteriormente someterlos al proceso de desinfección.
- El mejor método de desinfección fue aquel con mayor concentración de hipoclorito de sodio.
- El callo de *Phragmites australis* puede inducirse a partir de *explantes* de la planta en medios enriquecidos y condiciones controladas de luz y temperatura, con concentraciones de 2 y 4 mg/L de 2,4-D como regulador de crecimiento, generando mayor rendimiento de callo la concentración de 4 mg/L.
- La sustitución del uso de 2,4-D por dicamba como regulador de crecimiento en el medio de cultivo aumentó la producción de callo de *Phragmites australis*.
- Las concentraciones de 0, 0.2, 0.4 y 0.6 mg/L Cd en el medio, no mostraron diferencias significativas en el crecimiento del callo, por lo que se deduce que no tiene un efecto tóxico sobre las células de *Phragmites australis*.
- *Phragmites australis* es una especie con capacidad de generación de embriones somáticos en callo bajo la inducción de reguladores de crecimiento.

Así mismo, dichos embriones pueden germinarse, promoviendo nuevamente la diferenciación celular al eliminar el regulador de crecimiento que resulta en la obtención de plantas nuevas.

Se corroboró la hipótesis de que el crecimiento del callo de *Phragmites australis* no se ve afectado cuando es sometido a diferentes concentraciones del cadmio equivalentes a las encontradas en el agua que sale de la operación unitaria de flotación de la mina cooperante.

5.2. Perspectivas

Para las siguientes etapas de la investigación se proyecta necesario realizar:

- La evaluación del efecto del cadmio sobre células en suspensión de *Phragmites australis* para posteriormente evaluar la viabilidad celular.
- Se sugiere añadir un marcador al cadmio para observar en que parte de la célula o tejido se acumula el cadmio y determinar el posible mecanismo de tolerancia que presenta *Phragmites australis*.
- Es deseable promover la germinación de los embriones somáticos expuestos a cadmio, con el fin de evaluar el efecto sobre esta capacidad.
- Debe confrontarse la tolerancia al cadmio de *Phragmites australis* con la de otras especies hidrofítas.

5.3. Recomendaciones para investigaciones futuras

Con base en la investigación, se recomienda considerar los siguientes aspectos:

- Existe un periodo de adaptación y crecimiento de las plantas posterior a la instalación de los reactores, aproximadamente de 3 semanas para que las

plantas se repongan del estrés ocasionado por la modificación del sustrato y clima.

- Se sugiere que los cortes de las plantas para la obtención de explantes sea de las partes superiores, dado que se presentan menor carga microbiana debido a que no está expuesta al medio acuoso y facilitará la desinfección, obteniendo mayor cantidad de medios de cultivo estériles.
- En caso de no contar con callo de *Phragmites australis* y se requiera inducirlo, el período de inducción de callo con 2,4-D tiene una duración aproximadamente de 10 semanas, se sugiere hacer la inducción con dicamba, ya que reduce el tiempo a 6 semanas.

ANEXOS

Anexo A-1. Datos experimentales

Tabla A-1.1. Masa de callo medida para determinar cinética de crecimiento

Id. Muestra	Masa de callo por cada día (g)									
	0	2	5	7	9	12	14	16	19	21
CC1	1.01	1.00	1.00	1.00	1.00	1.11	1.15	1.22	1.22	1.24
CC2	1.01	1.01	1.04	1.08	1.09	1.11	1.15	1.15	1.18	1.20
CC3	1.00	1.03	1.07	1.08	1.10	1.14	1.19	1.22	1.22	1.22
CC4	1.02	1.02	1.05	1.05	1.07	1.10	1.12	1.14	1.17	1.17
CC5	1.00	1.04	1.09	1.07	1.10	1.19	1.23	1.26	1.30	1.32
CC6	1.02	1.03	1.10	1.11	1.14	1.22	1.22	1.24	1.30	1.38
CC7	1.01	1.01	1.01	1.10	1.18	1.26	1.32	1.34	1.37	1.39
CC8	1.01	1.02	1.02	1.05	1.07	1.16	1.22	1.23	1.29	1.31
CC9	1.01	1.02	1.08	1.07	1.07	1.15	1.19	1.26	1.35	1.39
CC10	1.00	1.05	1.13	1.14	1.14	1.26	1.32	1.36	1.43	1.48
Promedio por día	1.01	1.02	1.06	1.08	1.10	1.17	1.21	1.24	1.28	1.31
Desviación estándar	0.01	0.01	0.04	0.04	0.05	0.06	0.07	0.07	0.09	0.10

Tabla A-1.2. Masa de callo medida cada semana en los medios de cultivo con diferente concentración de cadmio

Concentración de Cd (mg/L)	Id. de muestra	Masa de cada medición (g)					
		Semana 0	1° Semana	2° Semana	3° Semana	4° Semana	5° Semana
0.0	0A	1.00	1.26	1.26	1.32	1.34	1.31
	0B	1.00	1.16	1.22	1.24	1.23	1.21
	0C	1.00	1.18	1.21	1.25	1.25	1.25
	0D	1.00	1.23	1.23	1.23	1.21	1.19

Concentración de Cd (mg/L)	Id. de muestra	Masa de cada medición (g)					
		Semana 0	1° Semana	2° Semana	3° Semana	4° Semana	5° Semana
0.2	0E	1.00	1.18	1.22	1.23	1.23	1.20
	2A	1.00	1.19	1.15	1.12	1.13	1.14
	2B	1.00	1.25	1.23	1.20	1.21	1.18
	2C	1.00	1.19	1.18	1.20	1.18	1.20
	2D	1.00	1.10	1.12	1.12	1.10	1.08
0.4	2E	1.00	1.19	1.08	1.11	1.11	1.14
	4A	1.00	1.19	1.18	1.25	1.25	1.21
	4B	1.00	1.20	1.27	1.30	1.23	1.20
	4C	1.00	1.10	1.11	1.13	1.16	1.17
	4D	1.00	1.15	1.16	1.12	1.12	1.09
0.6	4E	1.00	1.18	1.18	1.19	1.19	1.17
	6A	1.00	1.22	1.25	1.26	1.23	1.26
	6B	1.00	1.18	1.20	1.20	1.18	1.18
	6C	1.00	1.27	1.27	1.31	1.33	1.30
	6D	1.00	1.17	1.18	1.21	1.22	1.20
	6E	1.00	1.17	1.21	1.20	1.22	1.22

Tabla A-1.3. Promedio de masa de callo medida cada semana en los medios de cultivo por cada concentración de cadmio

Concentración de Cd (mg/L)	Masa promedio de callo (g)					
	Semana 0	1° Semana	2° Semana	3° Semana	4° Semana	5° Semana
0.0	1.00	1.20	1.23	1.25	1.25	1.23
0.2	1.00	1.18	1.15	1.15	1.15	1.15
0.4	1.00	1.16	1.18	1.20	1.19	1.17
0.6	1.00	1.20	1.22	1.24	1.24	1.23

Tabla A-1.4. Desviación estándar de masa de callo medida cada semana en los medios de cultivo por cada concentración de cadmio

Concentración de Cd (mg/L)	Desviación estándar de mediciones de callo (g)					
	Semana 0	1° Semana	2° Semana	3° Semana	4° Semana	5° Semana
0.0	0.00	0.04	0.02	0.03	0.05	0.04
0.2	0.00	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04
0.4	0.00	0.04	0.05	0.07	0.05	0.04
0.6	0.00	0.04	0.03	0.04	0.05	0.04

Anexo A-2. Análisis estadísticos

Modelo

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$$i = 1, 2, \dots, a$$

$$j = 1, 2, \dots, b$$

$$a=4, b=6$$

$$\text{Hipótesis nula (H}_0\text{): } \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu$$

$$\text{Hipótesis alterna (H}_A\text{): } \mu_i \neq \mu_{a_i} \neq a$$

Observaciones

$$N = ab = 4 * 6 = 24$$

$Y_{i\cdot}$ = Suma de las observaciones de i-ésimo tratamiento

$$Y_{0.0} = 1.00 + 1.20 + 1.23 + 1.25 + 1.25 + 1.23 = 7.16$$

$$Y_{0.2} = 1.00 + 1.18 + 1.15 + 1.15 + 1.15 + 1.15 = 6.78$$

$$Y_{0.4} = 1.00 + 1.16 + 1.18 + 1.20 + 1.19 + 1.17 = 6.90$$

$$Y_{0.6} = 1.00 + 1.20 + 1.22 + 1.24 + 1.24 + 1.23 = 7.13$$

$$Y_{..} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij} = \sum_{i=1}^a Y_{i\cdot}$$

$$Y_{..} = 7.16 + 6.79 + 6.90 + 7.13 = 27.97$$

Suma de cuadrados

$$S_{Ct} = \sum_{i=1}^a \frac{Y_{i\cdot}^2}{b_i} - \frac{Y_{..}^2}{N}$$

$$S_{Ct} = \left(\frac{7.16^2}{6} \right) + \left(\frac{6.78^2}{6} \right) + \left(\frac{6.90^2}{6} \right) + \left(\frac{7.13^2}{6} \right) - \left(\frac{27.97^2}{24} \right) = 0.01$$

$$S_{CT} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{N}$$

$$S_{CT} = 1.00^2 + 1.20^2 + 1.23^2 + 1.25^2 + 1.25^2 + 1.23^2 + 1.00^2 + 1.18^2 + 1.15^2 + 1.15^2 + 1.15^2 + 1.15^2 + 1.00^2 + 1.16^2 + 1.18^2 + 1.20^2 + 1.19^2 + 1.17^2 + 1.00^2 + 1.20^2 + 1.22^2 + 1.24^2 + 1.24^2 + 1.23^2 - \left(\frac{27.97^2}{24} \right) = 0.14$$

$$S_{Ce} = S_{CT} - S_{Ct}$$

$$S_{Ce} = 0.14 - 0.01 = 0.13$$

Grados de libertad

$$a - 1 = 4 - 1 = 3$$

$$N - a = 24 - 4 = 20$$

$$N - 1 = 24 - 1 = 23$$

Cuadrado medio

$$CMt = \frac{SCt}{(\alpha - 1)} = \frac{0.01}{4 - 1} = 0.0033$$

$$CMe = \frac{SCe}{(N - \alpha)} = \frac{0.13}{24 - 4} = 0.0065$$

F Calculada

$$F_0 = \frac{CMt}{CMe} = \frac{0.0033}{0.0065} = 0.5077$$

Anexo A-3. Composición de sales para preparación de medios de cultivo

MEDIO DE CULTIVO CONOCIDO COMO MS (Murashigue y Skoog, 1962)

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M. (g)	CANTIDADES PARA UN LITRO (1X) EN:	
			MASA (mg)	MOLES (mM)
COMPUESTOS INORGÁNICOS				
Macronutrientes				
Nitrato de Potasio	KNO ₃	101.108	1900	18.791
Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	80.04	1650	20.614
Cloruro de Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	147.02	440	2.993
	CaCl ₂ .H ₂ O	128.99	385.93	2.993
	CaCl ₂	110.99	332.08	2.993
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	246.498	370	1.501
Fosfato de Potasio	KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	154.086	192.48	1.249
	KH ₂ PO ₄	136.09	170	1.249
	K ₂ HPO ₄	174.2	217.6	1.249
Micronutrientes				
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .4H ₂ O	223.0618	22.3	0.099
	MnSO ₄ .H ₂ O	169.01	16.7	0.099
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.54	8.6	0.0299
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	61.86	6.2	0.1002
Yoduro de Potasio	KI	166.01	0.83	4.99x10 ⁻³
Sulfato de Cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	249.68	0.025	0.1μM
Molibdato de Sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241.95	0.25	1.03μM
Cloruro de Cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	237.93	0.025	0.105μM
Sulfato Ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	278.028	27.8	0.1
Na ₂ EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂	336.2	33.28	0.099
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O	372.3	37.3	0.099

MEDIO DE CULTIVO CONOCIDO COMO B₅ (Gamborg et al., 1968)

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M. (g)	CANTIDADES PARA UN LITRO (1X) EN:	
			MASA (mg)	MOLES (mM)
COMPUESTOS INORGÁNICOS				
Macronutrientes				
Nitrato de Potasio	KNO ₃	101.108	2500	24.726
Cloruro de Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	147.02	150	1.02
	CaCl ₂ .H ₂ O	128.99	131.56	1.02
	CaCl ₂	110.99	113.2	1.02
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	246.498	250	1.014
Fosfato de sodio	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	156.01	150	0.96
	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	137.99	132.47	0.96
	NaH ₂ PO ₄	119.98	115.18	0.96
Sulfato de Amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	132.146	134	1.014
Micronutrientes				
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .4H ₂ O	223.0618	13.16	0.059
	MnSO ₄ .H ₂ O	169.01	10	0.059
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.55	2	0.00695
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	61.833	3	0.048
Yoduro de Potasio	KI	166.01	0.75	0.00451
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	249.68	25µg	1.001x10 ⁻⁴
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241.95	250µg	0.001033
Cloruro de Cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	237.93	25µg	1.05x10 ⁻⁴
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	278	21.128	0.076
Na ₂ EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂	336.2	25.55	0.076
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O	372.2	28.28	0.076
COMPUESTOS ORGÁNICOS				
AMINOÁCIDOS				
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07	NO	0
VITAMINAS				
Myo-Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.2	100	0.555
Tiamina-HCl	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ S.HCl	337.3	10	0.00296
Ácido Nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	123.1	1	8.123x10 ⁻³
Piridoxina-HCl	C ₈ H ₁₁ NO ₃ .HCl	205.6	1	4.864x10 ⁻³

Anexo A-4. Disposición controlada de los residuos de esta investigación

Los residuos producidos en esta experimentación no fueron tratados en el laboratorio, se almacenaron y posteriormente se entregaron a la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM, (UGA) para su tratamiento y disposición controlada.

Referencias bibliográficas

- Alvarado, Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo in vitro de plantas. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. Pp. 81-104.
- Álvarez, A. 1994. Cultivo de Tejidos Vegetales. Reguladores del crecimiento vegetal. Trillas. Pp. 48-66. Ciudad de México, México.
- Amábilis-Sosa, L.E. 2015. Remoción de metales pesados en humedales artificiales inoculados con cepas tolerantes. Tesis de Doctorado en Ingeniería. Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería (Ingeniería Ambiental, Agua). UNAM. Defensa: Agosto 7, 2015. Consulta: 26 de octubre de 2021. Dirección: <http://132.248.9.195/ptd2016/febrero/0741155/Index.html>
- Amábilis-Sosa, L.E., Salgado-Bernal, I., Siebe, C.D., Moeller-Chávez, G.E., García-Gómez, R.S., Durán-Domínguez-de-Bazúa, M.-d.-C. 2016. Useful microorganisms for environmental sustainability: Application of heavy metal tolerant consortia for surface water decontamination in natural and artificial wetlands. En *The Handbook of Microbial Bioresources*. V.K. Gupta, National University of Ireland Galway, Ireland, G. D. Sharma, Bilaspur University, India, M. G. Tuohy, National University of Ireland Galway, Ireland, R. Gaur, Avadh University, India, editores. CABI. ISBN 9781780645216. Chapter 26. Pp. 426-440. Oxfordshire, United Kingdom. June.
- Amábilis-Sosa, L.E., Arroyo-Ginez, M., Pérez-González, R., Roé-Sosa, A., Ramírez-Burgos, L.I., Durán-Domínguez-de-Bazúa, M.d.C. 2018a. Effect of support media on heavy metals removal in constructed wetlands inoculated with metallotolerant strains. In *Artificial or Constructed Wetlands: A Suitable Technology for Sustainable Water Management*. María del Carmen Durán-Domínguez-de-Bazúa (Mexico), Amado Enrique Navarro-Frómata (Mexico), Josep María Bayona Termens (Spain), Eds. CRC Press, 1st edition. ISBN-10: 1138739189. ISBN-13: 978-1138739185. Chapter 3. Pp. 91-109. (June 30). Boca Raton, Florida, EE.UU.

- Amábilis-Sosa, L.E., Bernal-González, M., Cano-Rodríguez, M.I., Durán-Domínguez, M.d.C., Espinosa-Aquino, B., García-Gómez, R.S., Kappelmeyer, U., Navarro-Frómata, E.E., Ramírez-Burgos, L.I., Ruiz-Cárdenas, N.J., Salgado-Bernal, I., Salinas-Juárez, M.G., Sánchez-Tovar, S.A., Solís-Fuentes, J.A. 2018b. Una tecnología que nos ayuda a tratar el agua residual (la que ya utilizamos), para proteger el ambiente: Humedales artificiales o construidos. Serie fascicular **Somos agua**. Órgano de divulgación de la Red Temática de Gestión de la Calidad y Disponibilidad del Agua. Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Número 2, 16 páginas. Agosto, 2000 ejemplares. México.
- Ayala-Vázquez, I. 2008. Células vegetales en biotransformaciones: Tamizado de la reacción de oxidación de eugenoles/ácidos hidroxicinámicos y dimerización oxidativa del eugenol con cultivos de nueve plantas. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Ciudad de México, México.
- Bazúa-Rueda, E.R., Bernal-González, M., Amábilis-Sosa, L.E., Cano-Rodríguez, M.I., García-Gómez, R.S., Ramírez-Burgos, L.I., Salgado-Bernal, I., Sánchez-Tovar, S.A., Solís-Fuentes, J.A., Durán-Domínguez-de-Bazúa, M.d.C. 2020. Mining, water and society: Recycling of mining effluents as a social solution to the use of water in Mexico. In Water availability and management in Mexico. E.M. Otazo-Sánchez, A.E. Navarro-Frómata, V.P. Singh (eds.). Chapter 19. Pp. 389-411. Water Science and Technology Library 999. Springer Nature Switzerland AG. https://doi.org/10.1007/978-3-030-24962-5_19
- Cabrera, L. 2022. Diccionario de aztequismos. Revisión y puesta en orden: J. Ignacio Dávila-Garibi. Términos nahuas: Luis Reyes-García. Términos latinos (clasificaciones botánicas y zoológicas): Esteban Inciarte. Ed. Colofón S.A. 5ª edición. ISBN 968-867-038-3. Ciudad de México, D.F., México.
- Calva-Calva, G., Pérez-Vargas, J., Palma-Cruz, F. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro. Revista Digital Universitaria. 6(11):2-16. Consulta: 26 de octubre de 2021. Dirección: http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov_art104a.pdf

- Carbajal, B. 2021. Mineras foráneas tienen en la mira el litio mexicano. La Jornada. Consulta: 26 de octubre de 2021. Dirección: <https://www.jornada.com.mx/notas/2021/03/28/economia/mineras-foraneas-tienen-en-la-mira-el-litio-mexicano/>
- Cárdenas, J. 2013. La minería en México: Despojo a la Nación. Rev. Mexicana Derecho Constitucional 28, 35–74.
- CCH-Sur. 2014. <https://www.cch-sur.unam.mx/>
- Colaboradores de Wikipedia (1). 2022. Cadmio [en línea] (2022, 07 de abril). Wikipedia, La enciclopedia libre, 2022. Consulta: 20 de marzo del 2022. Dirección: <https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Cadmio&oldid=142765258>.
- Colaboradores de Wikipedia (2). 2022. *Phragmites australis* [en línea] (2022, 24 de febrero). Wikipedia, La enciclopedia libre. Fecha de consulta: 23 de marzo de 2022. Dirección: https://es.wikipedia.org/wiki/Phragmites_australis
- CONABIO. 2009. Catálogo taxonómico de especies de México. CONABIO, Ciudad de México, México. Consulta: 07 de octubre de 2021. Dirección: <http://bdi.conabio.gob.mx/fotoweb/archives/5023-Plantas/Plantas/OTV5088%20Phragmites%20australis.jpg.info>
- Csuros, M., Csuros, C. 2002. Environmental Sampling and Analysis for Metals. Lewis Publishers Ed. 372 pp. Boca Raton, Florida. EEUU.
- Cuéntame de México. 2019. Minería. INEGI. Consulta: 07 de octubre de 2021. Dirección: <http://cuentame.inegi.org.mx/Economia/secundario/mineria/default.aspx?tema=e>
- Dietz, K.J., Baier, M., Krämer, U. 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. En Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems. Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J. (Eds.) Springer. Pp. 73-97. Berlín, Alemania.
- Doerner, P. 2000. Cell division regulation. En Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.). American Society of Plant Physiologists, pp. 528-567. Washington, EE.UU. Consulta: 26 de octubre de 2021. Dirección:

https://disk.yandex.ru/i/usoFMA6hmuqjm?fbclid=IwAR2AXLNLtid1Y5ImKA2CyYJOZ_ApOv6PEGqdr_ozINrsPE3e1sz-z859dN4

- DOF. 1996a. Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Poder Ejecutivo Federal. Estados Unidos Mexicanos.
- DOF. 1996b. Norma Oficial Mexicana NOM-002-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal. Diario Oficial de la Federación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Poder Ejecutivo Federal. Estados Unidos Mexicanos.
- DOF. 2003. Norma Oficial Mexicana NOM-141-SEMARNAT-2003, que establece el procedimiento para caracterizar los jales, así como las especificaciones y criterios para la caracterización y preparación del sitio, proyecto, construcción, operación y postoperación de presas de jales. Diario Oficial de la Federación: Lunes 13 de septiembre de 2004. Poder Ejecutivo Federal. Estados Unidos Mexicanos.
- DOF. 2009. Diario Oficial (Primera Sección). Modificación del inciso 0, el encabezado de la Tabla 13, el último párrafo del Anexo B y el apartado Signo decimal de la Tabla 21 de la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema general de unidades de medida. CUARTO.- Se modifica el encabezado de la tabla 13 para quedar como sigue: Tabla 21 – Reglas para la escritura de los números y su signo decimal. Signo decimal: El signo decimal debe ser una coma sobre la línea (,) o un punto sobre la línea (.). Si la magnitud de un número es menor que la unidad, el signo decimal debe ser precedido por un cero. Diario Oficial de la Federación: Jueves 24 de septiembre de 2009. Poder Ejecutivo Federal. Estados Unidos Mexicanos.
- Duffus, J.H. 2002. Heavy metals - A meaningless term? IUPAC Technical Report. Pure Appl. Chem. 74:793-807. DOI: 10.1351/pac200274050793

- Durán-de-Bazúa, C. (Profesora), Rodríguez-Cruz, A. Varela-Montellano, E. (Estudiantes). 1998. Manual de construcción, arranque y operación de humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales de casas habitación en zonas rurales o suburbanas y para el tratamiento terciario de aguas residuales de casas habitación o de condominios verticales suburbanos. Serie: Química Ambiental del Agua. Vol. 6 bis. Pub. Prog. Ing. Quim. Amb. y de Quim. Amb. UNAM. Facultad de Química, 27 pags. 500 ejemplares, 1a. Ed. (1998). 50 ejemplares, 2ª. Ed. (2003). 50 ejemplares. Ciudad de México, México.
- Eguiarte, L. E., R. Colin., E. Aguirre-Planter y M. Rosas. 2011. Ecología evolutiva de dos especies invasoras de humedales en la República Mexicana: *Arundo donax* y *Phragmites australis* (Poaceae). Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ecología. Informe final SNIBCONABIO, proyecto No. GN038. México. D. F.
- EPA. 2000. Folleto informativo de tecnología de aguas residuales. Humedales de flujo libre superficial. Agencia de Protección al Ambiente. Washington, D.C. EE. UU.
- Estime, L., O'Shea, M., Borst, M. 2002. Suspension culture and plant regeneration of *Typha latifolia*. Hortscience. 37(2):406-408.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cellular Research. 50:151-158.
- García-Mercado, H.D. 2016. Biogeoquímica del mercurio en procesos biológicos de remediación con cuatro especies vegetales a nivel de laboratorio. Tesis de Doctorado en Ingeniería. Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería (Ingeniería Ambiental, Suelo). UNAM. Defensa: Abril 22, 2016.
<http://132.248.9.195/ptd2016/febrero/0741155/Index.html>
- González-Becerra, C. 2017. La minería y la economía del conocimiento en México. Tesis de licenciatura. Facultad de Economía. Universidad Nacional Autónoma de México. Noviembre. Ciudad de México. México.
<http://132.248.9.195/ptd2017/octubre/0767080/0767080.pdf>
- González-Mendoza, D., Zapata-Pérez, O. 2008. Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. Bol. Soc. Bot. Méx. 82:53-61.

- Hammer, D.A., Bastian, R.K. 1989. Wetland ecosystems: Natural water purifiers? In *Constructed wetlands for wastewater treatment municipal, industrial and agricultural*. D.A. Hammer (ed). Lewis Publishers. Boca Raton, FL, EE.UU.
- Hernández-Baranda, Y., Rodríguez-Hernández, P., Peña-Icart, M., Meriño-Hernández, Y., Cartaya-Rubio, O. 2019. Toxicidad del cadmio en las plantas y estrategias para disminuir sus efectos. Estudio de caso: El tomate. *Cultivos Tropicales*. 40(3), e10. Ediciones Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. ISSN impreso: 0258-5936. ISSN digital: 1819-4087.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362019000300010#B8
- Hernández-Navarrete, M.J., Celorrio-Pascual, J.M., Lapresta-Moros, C., Solano-Bernard, V.M. 2014. Fundamentos de antisepsia, desinfección y esterilización. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 32(10):681-688.
- Hussain, A., Qarshi, I.A., Nazir, H., Ullah, I. 2012. Plant tissue culture: Current status and opportunities. In *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. Leva, A., Rinaldi, L.M. (Eds.). Pp. 1-28. IntechOpen. Rijeka, Croacia.
<http://dx.doi.org/10.5772/50568>
- INECC. 2007. *Industria Minera*. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. Consulta: 05 de octubre de 2021. Dirección: http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/16/parte3_12.html
- INEGI. 2015. *Síntesis metodológica de la industria minerometalúrgica*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Consulta: 07 de octubre de 2021. Dirección: <https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825075514>
- Kuntz-Ficker, S. 2010. *Historia económica general de México: de la colonia a nuestros días*. Colegio de México. Ciudad de México, México.
- Linhart, Y.B., Grant, M.C. 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 27:237-277.
- Lomelín-Guillén, J. Peñoles, Una exitosa empresa minera mexicana. Conferencia, Agosto 30, 2007.

- López-Bárceñas, F.² 2017. La vida o el mineral. Los cuatro ciclos del despojo minero en México. Akal/Interpares. ISBN 968-607-97537-1-9. Ciudad de México, México. http://www.akal.com/libro/la-vida-o-el-mineral_35249
- Morales-Rubio, M.E., Espinosa-Leal, C., Garza-Padrón, R.A. 2016. Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en productos naturales. En Investigación en plantas de importancia médica. En OmniaScience. Rivas Morales, C., Oranday-Cárdenas, M.A., Verde-Star, M.J. (Eds.). Pp. 351-410. Barcelona, España. Consulta: 26 de octubre de 2021. Dirección: <https://www.omniascience.com/books/index.php/monographs/catalog/download/97/410/824-1?inline=1>
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*. 15:473-497.
- Ochoa-Villarreal, M., Howat, S., Jang, M.O., Kim, I.S., Jin, Y.W., Lee, E.K. 2015. Cambial meristematic cells: A platform for the production of plant natural products. *New Biotechnology*. 32(6):581-587. Consulta: 26 de octubre de 2021. Dirección: <http://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.02.003>
- Osorio-García, J. 2018. Evaluación del crecimiento de cultivos celulares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de dos variedades expuestas a condiciones de estrés hídrico. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Química. Ciudad de México, México.
- Palacios-Vargas, J.G., Mejía-Recamier, B.E., Cutz-Pool, L.Q. 2009. Microartrópodos edáficos. Biodiversidad del ecosistema del Pedregal de San Ángel. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México. Consulta: 26 de octubre de 2021. Dirección:

² Francisco López-Bárceñas es originario de la comunidad de Santa Rosa Caxtlahuaca, en la mixteca oaxaqueña, cuenta con estudios de posgrado en Derecho y Desarrollo Rural. Profesor, investigador y asesor de comunidades indígenas, ha desempeñado también cargos comunitarios en su localidad de origen y ha dedicado parte de su tiempo a documentar la historia de los pueblos mixtecos, de los movimientos indígenas contemporáneos y las transformaciones del Estado y su legislación. Entre sus libros más importantes se encuentran: Legislación y derechos indígenas en México (1998); Autonomía y derechos indígenas en México (1998); La diversidad mutilada. Los derechos indígenas en el estado de Oaxaca (2001); Rebeliones indígenas en la mixteca (2007); El derecho de los pueblos indígenas a la consulta (2013); El fuego y las cenizas: los pueblos mixtecos en la guerra de Independencia (2011); Rebeldes solitarios. El magonismo entre los pueblos mixtecos (2013); ¡La tierra no se vende! Las tierras y los territorios de los pueblos indígenas en México (2015) y El régimen de la propiedad agraria en México (2017)

http://www.repsa.unam.mx/documentos/Palacios-Vargas_et_al_2009_Microartropodos.pdf

- Parker, C. 2008. *Phragmites australis* (common reed). CABI: Invasive Species Compendium. Consulta: 28 de marzo de 2022. Dirección: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/40514#todescription>
- Pérez-Molphe-Balch, E.M., Ramírez-Malagón, R., Núñez-Palenius, H.G., Ochoa-Alejo, N. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. Consulta: 26 de octubre de 2021. Dirección: https://editorial.uaa.mx/catalogo/ccb_tejidos_vegetales_9686259627.html#:~:text=Se%20le%20llama%20Cultivo%20de,condiciones%20artificiales%2C%20ax%C3%A9nicas%20y%20controladas.
- Poy-Solano, L. 2006. Procesos hidrometalúrgicos, fuente de contaminación de mantos freáticos. La Jornada. Consulta: 26 de octubre de 2021. Dirección: <https://www.jornada.com.mx/2006/04/18/index.php?section=ciencias&article=a03n1cie>
- Ramos-Rodríguez, T.M. 2006. Regeneración de melón (*Cucumis melo* L.) bajo condiciones *in vitro* como modelo biológico. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Ruiz-López, V. 2009. Remoción de cadmio y zinc de aguas residuales de una industria minera mediante reactores biológicos que simulan un humedal artificial. Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Ciudad de México, México. Consulta: 26 de octubre de 2021. Dirección: <http://132.248.9.195/ptd2009/septiembre/0648758/Index.html>
- Ruiz-López, V., González-Sandoval, M.d.R., Barrera-Godínez, J.A., Moeller-Chávez, G., Ramírez-Camperos, E., Durán-Domínguez-de-Bazúa, M.d.C. 2010. Remoción de Cd y Zn de una corriente acuosa de una empresa minera usando humedales artificiales / *Cadmium and zinc removal from a mining reprocessing aqueous stream using artificial wetlands*. Technol. Ciencia Ed. (IMIQ). 25(1):27-34.

- Salinas-Juárez, M.G. 2016. Estudio de la generación de electricidad en un humedal artificial asistido electroquímicamente. Tesis de Doctorado en Ingeniería. Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería (Ingeniería Ambiental, Suelo). UNAM. Defensa: Diciembre 02. Consulta: 26 de octubre de 2021. Dirección: Acceso restringido por la Autora (Humedal artificial para la generación de electricidad. Solicitud de Registro de patente: Diciembre 29, 2017. María Guadalupe Salinas Juárez, Pedro Roquero Tejeda y María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa, Facultad de Química, UNAM. Coordinación de Gestión de Propiedad Intelectual, Coordinación de Propiedad Intelectual, Dirección General de Vinculación, Coordinación de Innovación y Desarrollo de la UNAM. Solicitud de registro con el IMPI expediente MX/a/2017/015327 folio MX/E/2017/088197. Dirección General de Invenciones y Marcas. Departamento de Patentes. Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial. MÉXICO)
- Secretaría de Economía. 2011. Cadenas productivas del sector minero: Una guía metodológica. Secretaría de Economía. Consulta: 12 de octubre de 2021. Dirección:
https://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/guia_metodo_cadenas_prod_sector_minero.pdf
- Secretaría de Economía. 2021. Minería. Gobierno de México. Consulta: 26 de octubre de 2021. Dirección: <https://www.gob.mx/se/acciones-y-programas/mineria>
- Street, H. E. 1977. Cell (suspension) cultures techniques. En Plant tissue and cell culture. Street, H.E. (Ed). Blackwell Scientific Publishing. Pp. 61-102. Oxford, Inglaterra.
- Tlamayanco-Castro, M. 2022. Ambiente y comercio internacional, consideraciones contempladas en el T-MEC / *Environment and international trade, considerations contemplated in T-MEC*. In *Sustainability and development: 2. Socioeconomical aspects* / Sustentabilidad y desarrollo: 2. Aspectos socioeconómicos. Durán-Domínguez-de-Bazúa, M.d.C. (Ed.). Cap. 7. Pp. 151-173. AM Editores. Ciudad de México, México.

<https://ambiental.unam.mx/albunimagenes/2021-DAAD/SUSTENTABILIDAD%20Y%20DESARROLLO%20VERSI%C3%93N%20FINAL.pdf>

[https://ambiental.unam.mx/albunimagenes/2020-DAAD/Sustentabilidad%20y%20desarrollo%20\(MdCDDdB%20Ed\).1.pdf](https://ambiental.unam.mx/albunimagenes/2020-DAAD/Sustentabilidad%20y%20desarrollo%20(MdCDDdB%20Ed).1.pdf)

- Volke-Sepúlveda, T., Velasco-Trejo, J.A., de-la-Rosa-Pérez, D.A. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. 144 pp. Ciudad de México, México.