

Implementación de un banco de Hongos Micorrícicos Arbusculares, aislados de suelos del área de influencia de EP PETROCUADOR y su efecto en el desarrollo de plantas de Maíz (*Zea mays*) en condiciones de estrés por cadmio, en La Joya de los Sachas, Provincia de Orellana-Ecuador

Ing. Boris Hernán Villacrés
Carrera de Ing. en
Biotecnología
Universidad de las Fuerzas
Armadas - ESPE
Sangolquí, Ecuador
borishvg@gmail.com

Dr. María Emilia Medina
Laboratorio de Microbiología
de Suelos
Universidad de las Fuerzas
Armadas - ESPE
Sangolquí, Ecuador
medina.maria@gmail.com

Luis Cumbal, PhD
Centro de Nanociencia y
Nanotecnología - CENCINAT
Universidad de las Fuerzas
Armadas ESPE, Sangolquí,
Ecuador
lhcumbal@espe.edu.ec

Ing. Ana Villarroel
Empresa Pública Petroecuador
(EP-PETROECUADOR)
La Joya de los Sachas, Ecuador
villarroelana_20@yahoo.es

Resumen

La presente investigación se realizó en dos etapas: En la primera, se implementó un banco de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) aislados de muestras de suelos recolectadas de diferentes pasivos ambientales, en la ciudad de La Joya de los Sachas, provincia de Orellana, Ecuador. Los análisis mostraron que la población de HMA es alta a pesar de la contaminación ambiental. En total se obtuvieron 32 cultivos monospóricos, en los cuales predominaron los géneros *Glomus* y *Acaulospora* (15 y 14 respectivamente). Adicionalmente, se obtuvieron 11 cultivos mixtos de HMA. En la segunda etapa de esta investigación, se estudió el efecto que tienen los hongos micorrícicos en el crecimiento de plantas de maíz (*Zea mays*) en condiciones de estrés por cadmio. Los resultados indicaron que las plantas poseen cierta tolerancia a la contaminación por cadmio, ya que algunas variables como el número de hojas muertas, biomasa total aérea, largo de la nervadura, ancho máximo y área de la tercera hoja, no se vieron influenciadas por la presencia de cadmio en los tratamientos. Los hongos micorrícicos arbusculares incrementaron el desarrollo de la altura de las plantas, el número de hojas vivas y el diámetro del tallo. Además, con la presencia de los HMA disminuyó el número de hojas con clorosis y se redujeron los efectos tóxicos del cadmio, el cual impide el desarrollo normal de ciertos elementos en las plantas. También se observó que las plantas tratadas con HMA, disminuyeron los niveles de cadmio en el sustrato entre un 55% y 36% en comparación con las plantas no micorrizadas que redujeron la concentración del metal pesado entre el 27% y 11% por sí solas. Los resultados demostraron que los HMA permiten el desarrollo de plantas de maíz en condiciones de estrés por cadmio y que también participan en la absorción del metal pesado reduciendo su concentración en el suelo.

Palabras clave: micorrizas arbusculares, efectos tóxicos, cadmio, plantas de maíz, remoción, suelo.

Introducción

El trabajo con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) resulta muy beneficioso gracias a los efectos positivos que éstos proveen a las plantas en diferentes aspectos, por ejemplo como

biofertilizantes, promoviendo su desarrollo debido a que favorecen la captura de nutrientes [1], aumentando su supervivencia y su producción [2]. Además, les ayudan a soportar ambientes hostiles, ya que en algunos casos logran reducir los niveles tóxicos generados por metales pesados, como cadmio (Cd) y arsénico (As) generalmente presentes en sitios de contaminación. También, colaboran en la adaptación de las plantas a los suelos, favoreciendo su repoblación [3].

La abundancia y vigor de los hongos micorrícicos, determinantes en los resultados observados, dependen del suelo en el que estos se desarrollen [4]; por consiguiente, es de vital importancia identificar, analizar la población y determinar la efectividad de colonización de los HMA, puesto que los resultados pueden diferir significativamente según la especie de hongo con la que se trabaje.

El establecimiento de un banco de HMA de suelos de pasivos ambientales, constituye el primer paso y es esencial para el desarrollo de futuros proyectos, cuyos objetivos serán aprovechar los efectos benéficos que estos brindan a las plantas, destacándose principalmente la fitorremediación.

El cadmio (Cd) es uno de los metales pesados con mayor capacidad tóxica, junto con el mercurio (Hg), plomo (Pb), tecnecio (Tc) y otros metales más, son elementos sin funciones o efectos positivos en los seres vivos. También se los nombra con el término de elementos traza, ya que los efectos biológicos

que causan se pueden apreciar a partir de bajas concentraciones, en el rango de μM , debido a que no poseen una función biológica específica, no forman parte de los organismos vivos y se bioacumulan; su acción depende de la capacidad de sus iones para formar complejos estables con los componentes orgánicos de la materia viva [5].

Los efectos tóxicos del cadmio en plantas se manifiestan por una clorosis en las hojas, una disminución en el desarrollo de los tejidos y necrosis foliar. Estos efectos se producen porque que dicho metal tiene una alta afinidad por ligandos SH y puede unirse a metaloenzimas transportadores de zinc causando así, una deficiencia en la respiración celular, inhibición de la actividad enzimática y desnaturalización proteica [6].

Los HMA brindan un efecto positivo en las plantas, ya que pueden secuestrar metales tóxicos reduciendo la disponibilidad de éstos y así otorgan mayor resistencia al estrés generado por dichos metales [7]. También, se ha descrito que los HMA pueden resistir a los efectos nocivos del cadmio, ya que inmovilizan al metal dentro del micelio o en compartimientos como vesículas que son producidas dentro de las paredes de las células de las plantas [8].

El presente proyecto tiene como principales objetivos, la implementación de un banco de hongos micorrízicos arbusculares y determinar el efecto que los HMA tienen sobre el desarrollo de plantas de maíz en condiciones de estrés por cadmio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Primera etapa: Implementación de un banco de hongos micorrízicos arbusculares

Muestreo de Suelos y Análisis

El muestreo de suelos y raíces se realizó en 11 pasivos ambientales contaminados con hidrocarburos en la ciudad de La Joya de los Sachas. Se recolectó un total de 1 Kg compuesto de 3 muestras puntuales de cada pasivo ambiental [9]. Después de obtener las muestras, una alícuota fue

enviada a los laboratorios CESTTA donde se realizaron análisis químicos de concentración de cadmio (Cd) plomo (Pb) níquel (Ni) aplicando los métodos EPHA SW-846 N°3050B 7130, 7520 y 7420 respectivamente; además, se realizaron análisis del total de hidrocarburos (TH) (método TNRCC 1005) e hidrocarburos policíclicos aromáticos (APH) (EPA SW-8 N°8310 y N°3540).

Procesamiento de Muestras y Análisis de HMA

El procesamiento de muestras se realizó por decantación y tamizado húmedo (Gerdemann & Nicolson, 1964) con algunas variaciones. Las muestras fueron secadas a temperatura ambiente durante 3 a 4 días, posteriormente se pesaron 50 g (de muestras de suelo seco) a las que se aplicó 40 ml de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 0,5% durante 30 min. Luego se agitaron (durante 5 min) y se vaciaron a través de una columna de tamices de 500 μm (fracción A) 150 μm (fracción B) y 45 μm (fracción C) [10].

La extracción y conteo de esporas se realizó a partir del licuado, lavado y tamizado de las fracciones B y C, posteriormente se secaron las muestras a temperatura ambiente. Más tarde, se tomaron alícuotas del 20% y 10% para las fracciones B y C respectivamente, se centrifugaron a 3500 rpm por 5 min en tubos falcon conteniendo 25ml de agua destilada y 15ml de sacarosa 1N. Finalmente, el sobrenadante se tamizó, se lavó y se traspasó a cajas Petri cuadrículadas, donde se contaron y extrajeron las esporas con la ayuda de un estereomicroscopio; la población de esporas se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{(\# \text{ } 20) + (\# \text{ } 10)}{\text{ } } \quad (1)$$

Porcentaje de Colonización Radical

La determinación del porcentaje de colonización radical se realizó muestreando alrededor de 1-2 g de raíces provenientes de las muestras de suelos recolectadas. Primeramente, se colocaron las raíces en tubos de ensayo y se clarificaron con hidróxido de potasio (10%) por 15 min a 80°C. Luego se lavaron y se adicionaron 3 ml de ácido clorhídrico

(1%) por 3-4 min a temperatura similar. A continuación se descartó el ácido y tiñó las raíces con azul de tripano (0,05%) por 10-15min a 80°C. Finalmente se lavaron las raíces con lactoglicerol y se montaron las raíces en placas para realizar la cuantificación radical observando alrededor de 30 fragmentos por cada placa en un microscopio óptico aplicando la siguiente fórmula [11]:

(2)

Cultivos de Hongos Micorrízicos Arbusculares

Se utilizaron plántulas de Rey Grass como huésped para el desarrollo de los HMA. Para realizar los cultivos monospóricos, se inoculó una espora de HMA, extraída de las muestras de suelos contaminados, en la superficie de la raíz de una plántula de Rey Grass. Los cultivos fueron mantenidos durante 14 semanas, en cajas Petri conteniendo arena, más tarde los cultivos fueron transferidos a macetas de 1 L conteniendo suelo y arena en proporciones 2:1 respectivamente; finalmente se agregaron semillas de Rey Grass en los cultivos y se mantuvieron durante 12 semanas [12]. Los Análisis de los cultivos monospóricos se efectuaron mediante la extracción y conteo de esporas [10] y se determinó el porcentaje de colonización radical [11]. Más tarde, las esporas provenientes de los cultivos, se montaron en placas para examinar sus características y determinar el género basándose en la información descrita por el INVAM (International Vesicular Arbuscular Fungi Collection) [13].

Se realizaron cultivos mixtos de HMA, colocando 200 g de suelos extraído de pasivos ambientales con 600 gramos de sustrato conteniendo suelo, arena, tamo de café y fibra de palma en proporciones 4:2:1:1 respectivamente[14], los cultivos se mantuvieron durante 18 semanas y se evaluaron determinando el número de esporas y el porcentaje de colonización radical.

Segunda etapa: Efecto de los HMA en el Desarrollo de Plantas de Maíz (*Zea más*) en Condiciones de Estrés por Cadmio (Cd)

Diseño Experimental

Se estableció un diseño completamente al azar, los factores analizados fueron: la presencia/ausencia de Cd en el sustrato y la presencia o ausencia de HMA, de donde se obtuvieron 4 tratamientos con 12 repeticiones cada uno (Tabla 1).

Tabla1. *Tratamientos utilizados en el diseño experimental*

N°	Id	Treatment
1	COH0	Sin Cd and sin HMA
2	COH1	Sin Cd and con HMA
3	C1H0	Con Cd and sin HMA
4	C1H1	Con Cd and con HMA

Cada unidad experimental se compuso de 800 g de sustrato conteniendo suelo y arena en proporciones 2:1, respectivamente. Los tratamientos con Cd fueron preparados a una concentración de 2,1 ppm de Cd, añadiendo una solución de cloruro de cadmio (CdCl₂) [5]. Adicionalmente, se añadieron 65g de inóculo conteniendo 16,5 esporas/g en los tratamientos con HMA, resultando una concentración final de 1,34 esporas/g. El ensayo se montó sembrando 2 semillas de maíz y se mantuvo 11 semanas.

Análisis de Plantas de Maíz

El desarrollo de las plantas de maíz se midió, evaluando diferentes factores de crecimiento en las plantas como: altura de la planta; número de hojas vivas y muertas, número de hojas cloróticas; diámetro del tallo; biomasa aérea, radical y total; largo de la nervadura, ancho máximo y área foliar de la tercera hoja. Estos parámetros se midieron en la 1^{ra}, 5^{ta} y 11^{va} semana.

Análisis de Hongos Micorrícicos Arbusculares

Para determinar la influencia del cadmio en el desarrollo de los HMA, se evaluó el porcentaje de colonización radical y la población de esporas en la undécima semana del ensayo, utilizando los protocolos descritos previamente.

Análisis de Cadmio en Plantas de Maíz

Para determinar la concentración de Cd, se prepararon 3 muestras compuestas de suelo (conteniendo 4 unidades experimentales) por cada tratamiento y la concentración de Cd en la biomasa de las plantas, se midió en los laboratorios CESTTA utilizado en método AOAC 975,03.

La concentración de Cd en el sustrato, se determinó aplicando el método EPA-3051[15]. Primeramente, se secaron 5 g de muestra durante 12 horas a 105°C, luego se pulverizaron y posteriormente 1 g de muestra fue digerido en un microondas MARSXpress en solución de ácido nítrico 3:1 de ácido nítrico (65%) y ácido clorhídrico (37%) respectivamente, programando como se indica en la Tabla 2.

Tabla2. Parámetros de digestión en microondas para muestras de suelos EPA-3051 [15].

Potencia		Tiempo de Rampa	Temperatura	Tiempo de Mantenimiento
Nivel	Porcentaje			
1600W	100	5:30	175°C	4:30

El material digerido se filtró y luego se analizó en un espectrofotómetro de absorción atómica marca iCE 3000 SERIES. Las soluciones estándar de Cd (0,5 ppm, 1ppm, 1,5 ppm, 2 ppm y 3 ppm) se prepararon disolviendo una solución madre de Cd (1000 ppm) en ácido nítrico (7%) [16].

La concentración de cadmio en el agua intersticial de los sustratos se realizó, extrayendo el agua con una bomba de vacío, utilizando un filtro de membrana de 0,45 µm (humedecidos con una solución 1:1 de HCl). Luego, el extracto fue llevado a pH 2 y almacenado a 4 °C hasta su análisis [17]. La digestión de las muestras se efectuó siguiendo el método EPA 3015A., con este método se digirieron

3 muestras por cada tratamiento (con 3 repeticiones para cada uno) con 5ml de ácido nítrico (37%) utilizando un microondas MARSXpress programado como se indica en la tabla 3 [18].

Tabla3. Parámetros de digestión en microondas para muestras de suelosEPA-3015A [18].

Potencia		Tiempo de Rampa	Temperatura	Tiempo de Mantenimiento
Nivel	Porcentaje			
1600W	100	10:00	175°C	4:30

El material digerido fue filtrado y posteriormente analizado en un espectrofotómetro de absorción atómica marca iCE 3000 SERIES, siguiendo el método311B (APHA) como se describe arriba [16].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primera etapa: Implementación de un banco de hongos micorrícicos arbusculares

Los análisis químicos de las muestras de suelos tomadas de los pasivos ambientales mostraron que, la mayor parte de éstos presentaron contaminación por cadmio, plomo o hidrocarburos totales de petróleo (Tabla 4). Por otro lado, se observó que las poblaciones y porcentajes de colonización radical de los HMA, en las muestras de suelos de los pasivos ambientales, fueron altos (Figuras 1a y 1b), presentando cierta resistencia a la contaminación ambiental, por lo que los HMA extraídos de las muestras de estos suelos, probablemente tengan resistencia al estrés generado por diferentes tipos de contaminación. Estudios previos reportan que cuando los HMA son expuestos a metales pesados, puede existir una selección de especies resistentes [18].

Tabla4. Análisis Químicos de las muestras de suelos de los pasivos ambientales

Muestra	TH (mg/kg)	HAP (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Pb(mg/kg)
	Límite E-S*	<1000	<1	<1	<40
Sa-42	263,83	<0,3	<0,8	39,55	<20
Sa-112	125,04	<03	1,03	<30	<20
Sa-45	497,71	<0,3	<0,8	<30	<20
Sa-Sur	123,55	<0,3	<0,8	<30	<20

Muestra	TH	HAP	Cd	Ni	Pb(mg/kg)
	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	
	Límite E-S*	<1000	<1	<40	<80
Sa-86	1295,44	<0,3	7,26	<30	241,26
Sa-97	9144,79	<0,3	1,02	<30	<20
Sa-67	17208,47	<0,3	0,96	<30	162,42
Sa-65	123,39	<0,3	<0,8	<30	<20
Sa-80	135,49	<0,3	1,27	<30	<20
Sa-38	870,81	<0,3	1,04	<30	<20
Sa-20	232,04	<0,3	<0,8	<30	<20

*E-S. Límites permisibles en un ecosistema sensible; TH. Hidrocarburos totales; HAP. Hidrocarburos aromáticos Policíclicos; Cd. Cadmio; Ni. Níquel; Pb. Plomo

De un total de 92 cultivos monospóricos realizados, 38 presentaron colonización micorrizógena radical entre un 15,66% y 64,22% (Figura 2). A pesar que los cultivos presentaron un bajo número poblacional de esporas, estos porcentajes nos indican que existe colonización por parte de los HMA en las raíces de las plantas. La escasez de esporas de HMA en los cultivos, hizo imprecisa la identificación de los HMA [20]. El éxito en la obtención de cultivos monospóricos de HMA es muy variable y depende de varios factores como el estado de la espora que se inocule, la cantidad de materia orgánica, los componentes del suelo, el tipo de huésped [21] e incluso la estación del año [12]. En total fueron identificados 15 cultivos del género *Glomus*, 14 de *Acaulospora*, 8 de *Entrophospora* y 1 cultivo en el que no se pudo identificar el género (Figuras 3 y 4). Los cultivos mixtos mostraron un nivel de esporas por debajo de las 4 esporas/g.

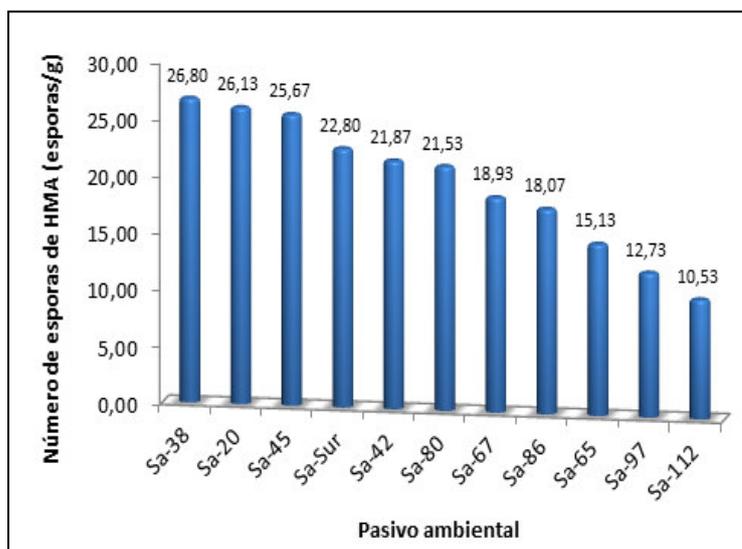


Figura 1a. Población de esporas de HMA en pasivos ambientales.

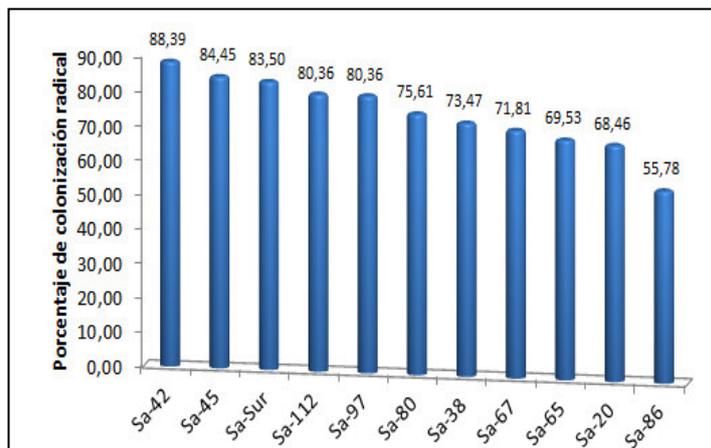


Figura 1b. Porcentaje de colonización radical de HMA en pasivos ambientales

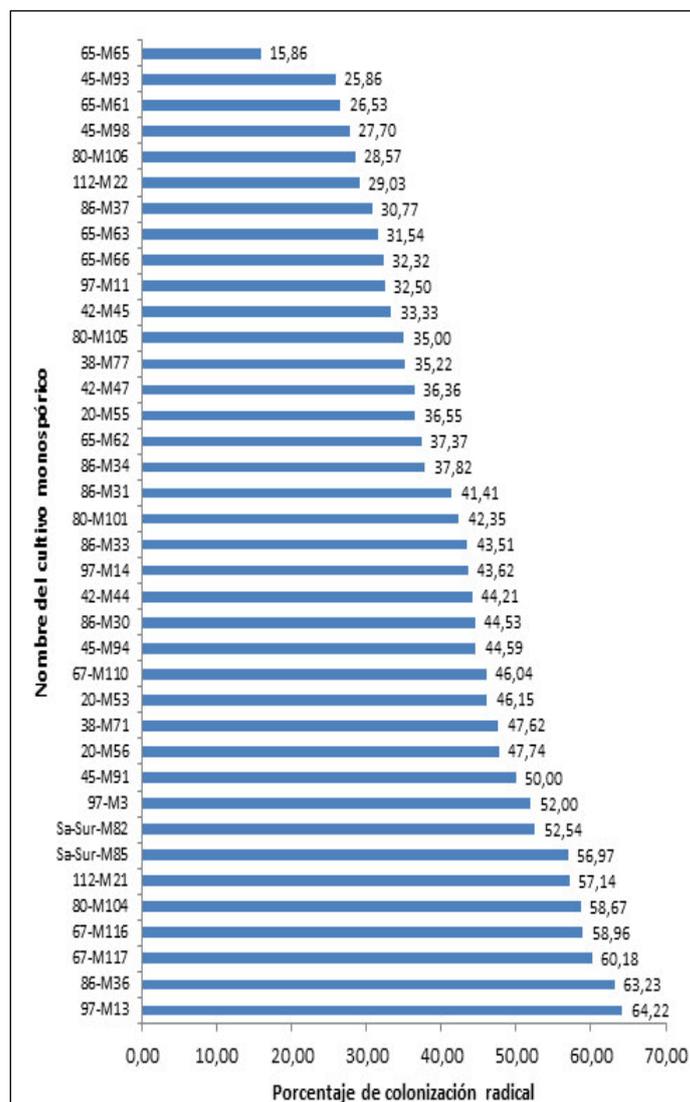


Figura 2. Porcentaje de colonización radical de HMA en cultivos monospóricos(12semanas).

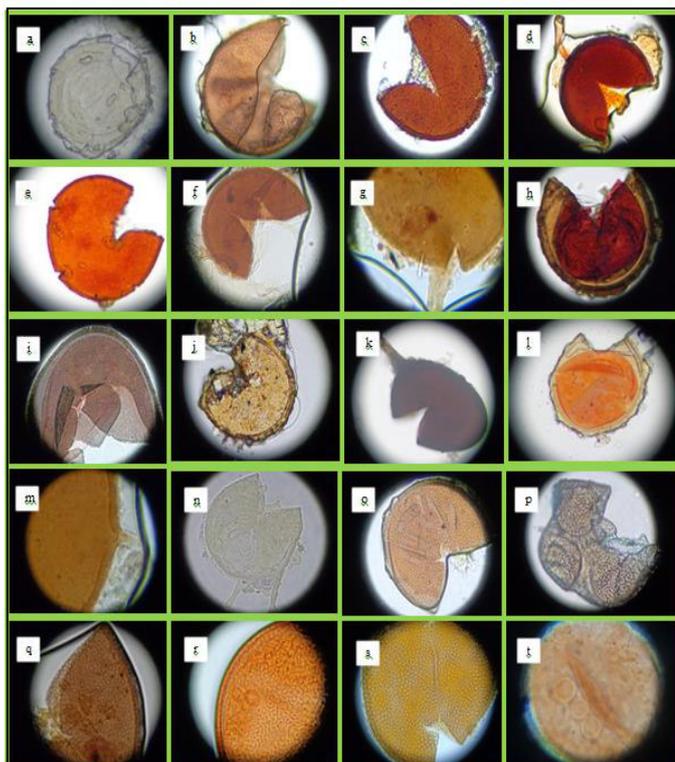


Figura 3. Esporas de los cultivos monospóricos de HMA. a) P12-M21 *Glomus*, b) P112-M22 *Acaulospora*, c) P20-M53 *Glomus*, d) P20-M55 *Glomus*, e) P20-M56 *Glomus*, f) P38-M71 *Entrophospora*, g) P38-M77 *Glomus*, h) P42-M44 *Entrophospora*, i) P42-M45 *Entrophospora*, j) P42-M47 *Glomus*, k) P45-M91 *Glomus*, l) P45-M93 *Entrophospora*, m) P45-M94 *Glomus*, n) P45-M98 *Glomus*, o) P65-M61 *Acaulospora*, p) P65-M62 *Acaulospora*, q) P65-M63 *Acaulospora*, r) P65-M65 *Acaulospora*, s) P65-M66 *Acaulospora*, t) P67-M110 *Unknown*.

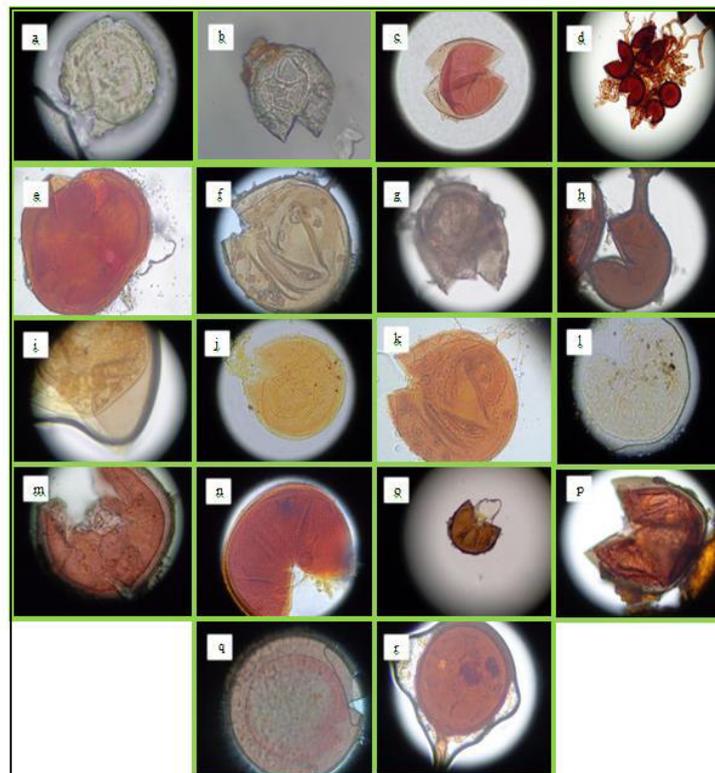


Figura 4. Esporas de los cultivos monospóricos de HMA. a) P67-116 *Glomus*, b) P67-117 *Glomus*, c) P80-101 *Entrophospora*, d) P80-104 *Glomus*, e) P80-105 *Entrophospora*, f) P80-106 *Entrophospora*, g) P86-30 *Acaulospora*, h) P86-31 *Glomus*, i) P86-33 *Acaulospora*, j) P86-34 *Acaulospora*, k) P86-36 *Acaulospora*, l) P86-37 *Glomus*, m) P97-11 *Acaulospora*, n) P97-13 *Acaulospora*, o) P97-14 *Acaulospora*, p) P97-3 *Acaulospora*, q) PSa-Sur-81 *Entrophospora*, r) PSa-Sur-85 *Glomus*.

Segunda etapa: Efecto de los HMA en el desarrollo de plantas de maíz (*Zea más*) en condiciones de estrés por Cadmio (Cd)

Los parámetros número de hojas muertas, diámetro del tallo, biomasa aérea y total, largo de la nervadura, ancho máximo y área foliar de la tercera hoja, no se vieron afectados por la presencia de cadmio en el suelo ni por la presencia de HMA. Se conoce que las plantas tienen ciertos mecanismos de resistencia a los efectos tóxicos del cadmio, entre ellos la acumulación del metal pesado en la vacuola, formación de complejos con sustancias y la presencia de enzimas tolerantes [5]. Sin embargo, se encontraron diferencias entre los diferentes

tratamientos al analizar la altura de las plantas, el número de hojas vivas y hojas con clorosis, el diámetro del tallo, así también existieron diferencias en el porcentaje de colonización radical, la población de esporas de HMA y la concentración de cadmio en la biomasa de plantas de maíz, en el sustrato y en el agua intersticial.

En la altura de las plantas se observó una influencia negativa a causa de la presencia de cadmio en la undécima semana (Figura 5a) probablemente debido a que el Cd inhibe la apertura estomática, impidiendo el desarrollo normal de las plantas de maíz [5]. Por otro lado, la presencia de HMA (en la undécima semana) tuvo un efecto positivo en la altura de las plantas de

maíz, se puede observar que los tratamientos con HMA tienden a aumentar su pendiente con el paso del tiempo (Figura 5b). Al respecto se conoce que el micelio de los hongos aumenta la captura del agua y la absorción de nutrientes, por lo que favorece el desarrollo de las plantas [22].

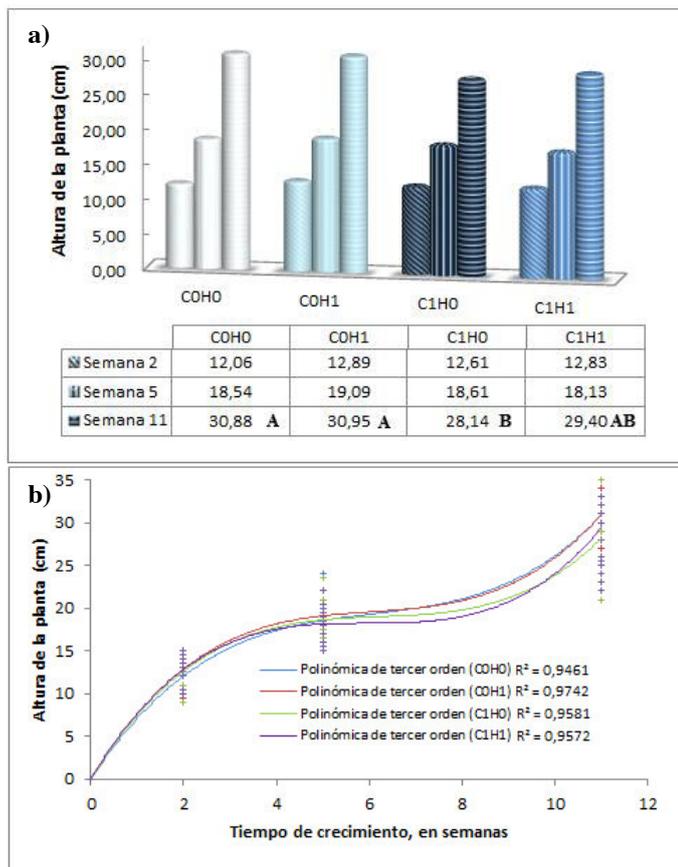


Figura 5. a) Altura de las plantas de maíz en las semanas 2, 5 y 11. b) Crecimiento de la planta de maíz durante el ensayo, aplicando los tratamientos: sin cadmio y sin HMA (COH0), sin cadmio y con HMA (COH1), con cadmio y sin HMA (C1H0), con cadmio y con HMA (C1H1).

Además, en la undécima semana, se observó un incremento en el número de hojas vivas en los tratamientos con HMA (Figura 6), posiblemente debido al beneficio que los HMA otorgan a las plantas en la absorción de agua y nutrientes; de esta manera las plantas se nutren mejor, aumentando la fotosíntesis y produciendo un mayor número de hojas [23]. En el tratamiento con cadmio y HMA (C1H1), se observó que la presencia de los hongos, hace que las plantas se

comporten similarmente al tratamiento sin cadmio (COH1), por lo que se puede decir que los HMA, aumentan la tolerancia frente al cadmio en las plantas. La resistencia a los efectos tóxicos del cadmio, posiblemente ocurre, gracias a estrategias de inmovilización de metales pesados en los grupos carboxilo (pKa-3,7); hidroxilo (pKa-10); sulfidril (pKa-3,67) y fosfato (pKa-1,97) de los componentes de la pared celular, como: la quitina, la melanina, la celulosa, los polisacáridos y estructuras lipídicas. Igualmente, la inmovilización puede ocurrir mediante la quelación con proteínas secretadas por el hongo, como son las metalotioneínas, polipéptidos como las fitoquelatinas, glicoproteínas como la glomalina; que por su riqueza en cisteína (18%-28%) son capaces de adsorber al metal pesado en sus grupos tioles (pKa-1,8) y carboxilo (pKa-1,65) [24]. De igual forma, los HMA pueden acumular Cd dentro de las vesículas que producen en las raíces [8].

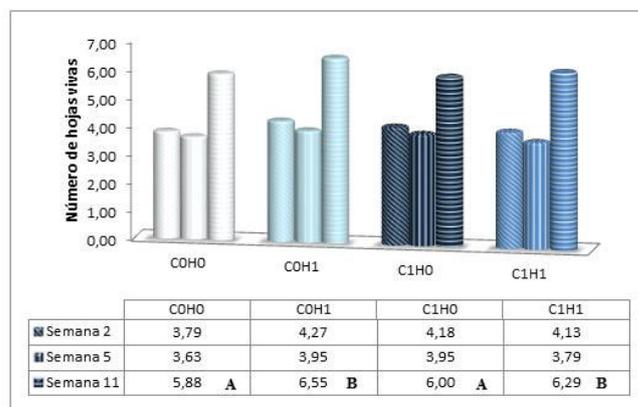


Figura 6. Número de hojas vivas en las plantas de maíz de acuerdo a los tratamientos aplicados: sin cadmio y sin HMA (COH0), sin cadmio y con HMA (COH1), con cadmio y sin HMA (C1H0), con cadmio y con HMA (C1H1), en las semanas 2, 5 y 11

El número de hojas cloróticas se incrementó con la presencia de cadmio en el sustrato de las plantas de maíz en las semanas 2 y 5, pero en la semana 11, a pesar del efecto tóxico causado por el Cd en el tratamiento (C1H0) existieron diferencias significativas en el tratamiento con HMA (COH1) (Figura 7). En ese sentido, se ha descrito que los HMA mejoran la absorción de nutrientes y minerales esenciales como el zinc

(Zn^{2+}) hierro (Fe^{2+}) manganeso (Mn^{2+}) [22]. Por otro lado, el cadmio inhibe la translocación de nutrientes esenciales como el Zn^{2+} , Mn^{2+} y Fe^{2+} hacia la planta, ya que el Cd se liga a proteínas transportadoras de estos metales, reemplaza al magnesio (Mg) en la molécula de clorofila, impide la apertura estomática [25] y obstaculiza las acciones de las enzimas responsables de la síntesis de clorofila, lo que genera una deficiencia en la producción de clorofila [5].

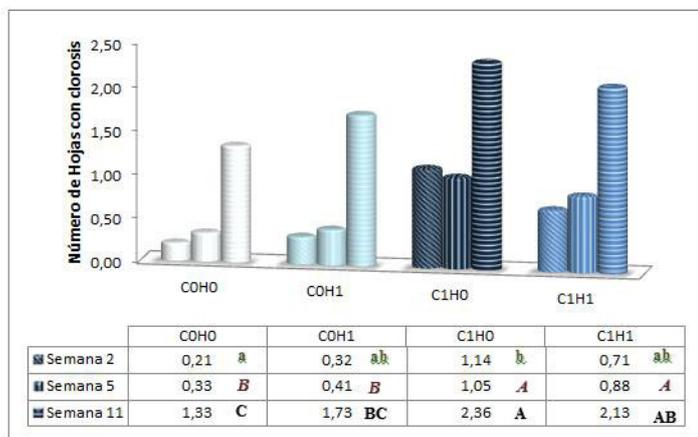


Figura 7. Número de hojas con clorosis en las plantas de maíz de acuerdo a los tratamientos aplicados: sin cadmio y sin HMA (COH0), sin cadmio y con HMA (COH1), con cadmio y sin HMA (C1H0), con cadmio y con HMA (C1H1), en las semanas 2, 5 y 11.

En los análisis de porcentaje de colonización radical, se observó que el tratamiento con cadmio (C1H1) tuvo menor nivel de colonización radical de HMA que en el tratamiento sin Cd (COH1) sin embargo a pesar del efecto negativo del cadmio en la colonización radical, los porcentajes de colonización en ambos tratamientos fueron altos (Figura 8) lo que significa que los hongos micorrícicos arbusculares tienen tolerancia al metal pesado [19]. Además, la presencia de cadmio no afectó la producción de esporas, ya que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con Cadmio (C1H0) y sin Cadmio (COH1) (Figura 9).

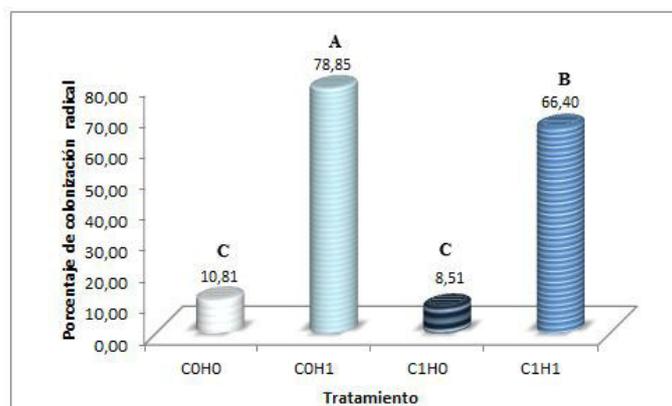


Figura 8. Porcentaje de colonización radical de HMA en las plantas de maíz de acuerdo a los tratamientos aplicados: sin cadmio y sin HMA (COH0), sin cadmio y con HMA (COH1), con cadmio y sin HMA (C1H0), con cadmio y con HMA (C1H1), en la semana 11.

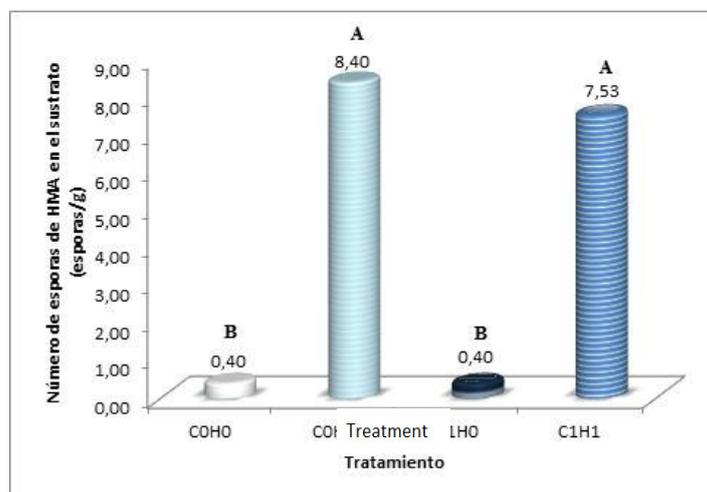


Figura 9. Población de esporas de HMA en el sustrato de acuerdo a los tratamientos aplicados: sin cadmio y sin HMA (COH0), sin cadmio y con HMA (COH1), con cadmio y sin HMA (C1H0), con cadmio y con HMA (C1H1), en la semana 11.

Los análisis de concentración de cadmio en la biomasa de las plantas de maíz mostraron que no existen diferencias entre los tratamientos con cadmio, posiblemente debido a la falta de suficientes repeticiones en los análisis o por el tiempo que duró el ensayo que fue de 11 semanas (Figura 10). Sin embargo, la presencia de cadmio en la biomasa de las plantas indica que las plantas de maíz tienen la capacidad de absorber cadmio del suelo y también que los HMA favorecen la absorción del metal pesado a través de su micelio [8].

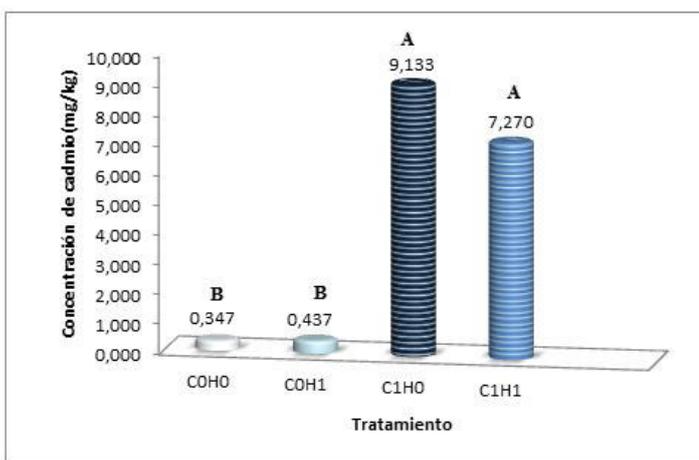


Figura 10. Concentración de cadmio en la biomasa de las plantas de maíz de acuerdo a los tratamientos aplicados: sin cadmio y sin HMA (COH0), sin cadmio y con HMA (COH1), con cadmio y sin HMA (C1H0), con cadmio y con HMA (C1H1), en la semana 11.

En los análisis de concentración de cadmio en el sustrato en la undécima semana, se observó que la concentración del metal disminuyó en mayor cantidad con la presencia de HMA (entre 55 y 36%) en el tratamiento C1H1 que en el tratamiento C1H0 (entre el 27 y 11%) el cual contenía plantas de maíz y cadmio (Figura 11) por lo que los HMA incrementan la absorción de Cd del suelo, por otro lado se observó que las plantas de maíz tienen la capacidad de absorber cadmio del suelo por si solas. Se conoce que los HMA pueden absorber metales pesados del suelo a través de su micelio con la ayuda de proteínas transportadoras de metales pesados [5].

La concentración de cadmio en el agua intersticial de los sustratos también disminuyó con la presencia de hongos micorrizógenos (C1H1) (Figura 12). Esto demuestra que los HMA ayudan a las plantas a reducir la concentración de cadmio en el agua de poro de los sustratos. La presencia de Cd en el agua intersticial, no indica que éste se encuentra biodisponible para las plantas que lo toman por procesos de sorción y desorción desde el sustrato.[25].

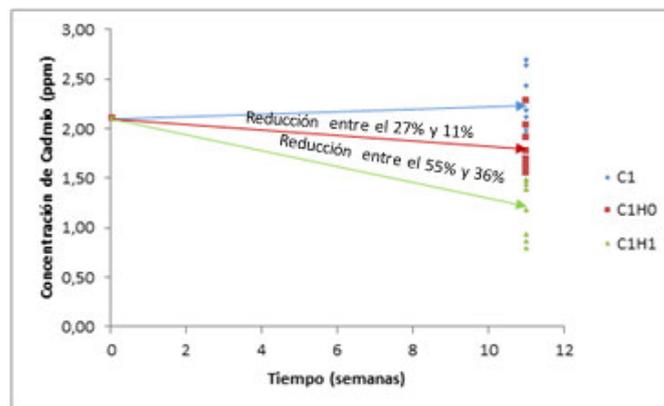


Figura 11. Concentración de cadmio en el sustrato durante las 11 semanas del ensayo, de acuerdo a los tratamientos aplicados: Control con cadmio (C1) aplicado sin plantas de maíz; y los tratamientos con plantas de maíz, con cadmio-sin HMA (C1H0), con cadmio-con HMA (C1H1).

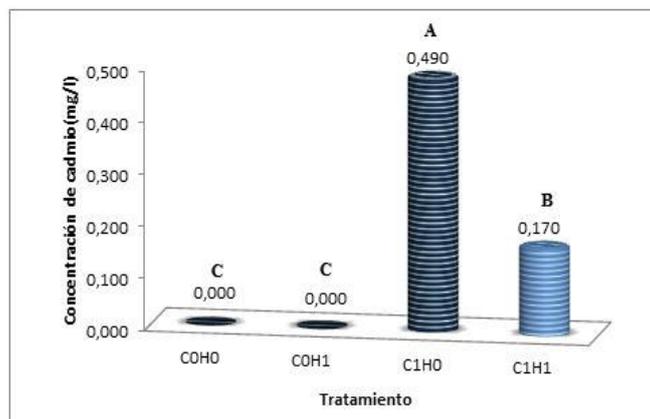


Figura 12. Concentración de cadmio en el agua de poro al final del ensayo (semana 11) de acuerdo a los tratamientos aplicados: sin cadmio-sin HMA (COH0), sin cadmio-con HMA (COH1), con cadmio y sin HMA (C1H0), con cadmio y con HMA (C1H1).

CONCLUSIONES

La mayoría de las muestras de suelos obtenidas de los pasivos ambientales, presentaron contaminación ambiental sobre los límites establecidos para ecosistemas sensibles. Se hallaron poblaciones y porcentajes de colonización altos de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) dentro de las muestras de los pasivos ambientales obtenidas, por lo que el desarrollo de los HMA no se vio afectado por la contaminación ambiental y consecuentemente las

esporas de HMA extraídas para la realización de cultivos monospóricos y mixtos, son esporas resistentes a la contaminación. Se obtuvieron 38 cultivos monospóricos de HMA, en los cuales predominaron los géneros *Glomus* y *Acaulospora* (15 y 14 respectivamente) además se elaboraron 11 cultivos mixtos de hongos micorrícicos arbusculares.

En la segunda etapa se observó que los parámetros de crecimiento: número de hojas muertas, biomasa aérea y total, largo de la nervadura, ancho y área foliar de la tercera hoja, no se vieron afectados por la presencia de los factores cadmio (Cd) ni por los hongos micorrícicos arbusculares, durante las 11 semanas del ensayo, por lo que la planta de maíz presenta cierta tolerancia o resistencia a la contaminación por cadmio (2,1 ppm).

La altura de los tallos de las plantas de maíz, se incrementó por la presencia de HMA en el sustrato, atenuando el efecto negativo que el cadmio tiene sobre estos parámetros y el número de hojas vivas en las plantas de maíz, igualmente se incrementó con los HMA.

El cadmio afectó a la producción de clorofila en las hojas de maíz, ya que se observó un aumento en el número de hojas con clorosis en los tratamientos contaminados con el metal pesado, pero la presencia de HMA redujo el efecto tóxico del cadmio, probablemente gracias a su capacidad de inmovilizarlo.

El porcentaje de colonización radical de los HMA disminuyó en el tratamiento con cadmio, sin embargo, este no influyó en el número de esporas de HMA, que manifestaron resistencia a la contaminación por el metal pesado.

Las plantas de maíz tratadas con HMA redujeron la concentración de cadmio en el sustrato entre 55% y 36%, a diferencia de las plantas no micorrizadas, que por sí solas disminuyeron su concentración entre 27% y 11%; demostrando que, la aplicación de los hongos micorrícicos arbusculares, aumenta la eficiencia en la

absorción del cadmio y que pueden ser utilizados en la detoxificación de suelos de pasivos ambientales.

El uso de los hongos micorrizógenos arbusculares, contribuyó en la reducción de la concentración de Cd en el agua de poro de los sustratos contaminados con el metal pesado, en comparación con el tratamiento de plantas con cadmio y sin HMA.

REFERENCIAS

- [1] E. Mohammadi, Y. Rezaee, R. Prasad and A. Varma, "Mycorrhizal fungi: What we know and what should we know?," in *Mycorrhiza: State of art, genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco.physiology, structure and systematics*, Tercera ed., A. Varma, Ed., Berlín, Springer, 2008, pp. 3-18.
- [2] J. A. Ramos, D. Marrufo, P. Guardarrama y L. Carrillo, «Hongos micorrízico-arbusculares,» de *Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán*, R. Durán García y M. E. Méndez González, Edits., Yucatán, CICT, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA, 2010, pp. 170-172.
- [3] M. C. González-Chávez, R. Carrillo-González, S. F. Wright y K. A. Nichols, «The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements,» *Environmental Pollution*, n° 130, pp. 317-323, 9 Enero 2004.
- [4] G. Bernal, «Tecnologías biológicas relacionadas con con la nutrición de la plama aceitera,» de *XI Congreso ecuatoriano de la ciencia del suelo*, Quito, Sociedad ecuatoriana de la ciencia del suelo, 2008.
- [5] C. Poschenrieder y J. Barceló, «Estrés por Metales Pesados,» de *Ecofisiología Vegetal: una Ciencia de Síntesis*, Thomson, 2004, pp. 413-429.
- [6] F. Rivera-Becerril, C. Calantzins, K. Turnau, J.-p. Caussanel, A. A. Belimov, S. Gianinazzi, R. J. Strasser y V. Gianinazzi-Pearson, «Cadmium accumulation and buffering of

- cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes.» *Journal of Experimental Botany*, vol. 53, n° 371, pp. 1177-1185, May 2002.
- [7] M. Vega, G. León, A. Jiménez, Y. Carreón y M. Martínez, «Efecto de las micorrizas arbusculares en el crecimiento de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) en suelos contaminados con aluminio,» *Resúmenes del IV Symposium nacional y II simposium iberoamericano de la simbiosis micorrízica*, p. 60, 2004.
- [8] W. Aguirre, G. Fischer y D. Miranda, «Tolerancia a metales pesados a través del uso de micorrizas arbusculares en plantas cultivadas,» *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, vol. 5, n° 1, pp. 141-153, 2011.
- [9] D. B. Knaebel, «Surface soil microbial sampling methods,» de *Manual of environmental microbiology*, Third ed., C. J. Hurst, R. L. Crawford, J. L. Gorland, D. A. Lipson, A. L. Mills y L. D. Stetzenbach, Edits., Washington D.C., ASM PRESS, 2007, pp. 597-605.
- [10] J. W. Gerdemann y T. H. Nicolson, «Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting,» *Transactions British Mycological Society*, vol. 46, pp. 235-244, 1964.
- [11] M. Bansal y K. Mukerji, «Root-clearing techniques and quantification of arbuscular mycorrhizal fungi,» de *Techniques in mycorrhizal studies*, K. Mukerji, C. Manoharachary y B. Chamola, Edits., Boston, Kluwer Academic Publishers, 2002, pp. 231-248.
- [12] J. Morton y Redecker, «Methods,» 2000b. [En línea]. Available: <http://invam.caf.wvu.edu>. [Último acceso: 14 Febrero 2013].
- [13] J. Morton and Redecker, "Classification of glomeromycota," 2000a. [Online]. Available: <http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/Gigasporaceae/Gigaspora/Gigaspora.htm>. [Accessed 25 Mayo 2012].
- [14] M. Brundrett, L. Melville and L. Peterson, Eds., *Practical methods in mycorrhizal research*, First ed., Guelph, Ontario: Micologue Publications, 1994, pp. 1-78.
- [15] US Environmental Protection Agency, EPA 3051A - Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, Soils and Oils, 2007.
- [16] American Public Health Association, "3111 B Direct Air-Acetylene Flame Method," in *APHA Method 3111: Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 8th ed., Washington, Victor Graphics, Inc., 1992.
- [17] CEPIS; PAHO; OMS, *Análisis de Metales en Agua Potable y Residual por Espectrofotometría de Absorción Atómica*, Lima: Programa de Control de Calidad y Desarrollo de Laboratorios, 1995.
- [18] A. Varma, Ed., *Mycorrhiza: State of art, genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco.physiology, structure and systematics*, Tercera ed., Berlín: Springer, 2008.
- [19] R. Kapoor, B. Giri y K. Mukerji, «Soil factors in relation to distribution and occurrence of vesicular arbuscular mycorrhiza,» de *Techniques in mycorrhizal studies*, K. Mukerji, C. Monoharachary y B. P. Chamola, Edits., Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2002, pp. 51-59.
- [20] S. Fracchia, A. Menendez, A. Godeas y J. A. Ocampo, «A method to obtain monosporic cultures of arbuscular mycorrhizal fungi,» *Soil Biology & Biochemistry*, pp. 1283-1285, 2001.
- [21] P. Chellappan, S. A. Anitha y A. Mahadevan, «Multiplication of arbuscular mycorrhizal fungi on roots,» de *Techniques in mycorrhizal studies*, K. Mukerji, C. Manoharachary y B. Chamola, Edits., Dordrecht, Kluwe Academic Publishers, 2002, pp. 285-297.
- [22] R. Atlas y R. Bartha, «Interacciones entre microorganismos y plantas,» de *Ecología microbiana y microbiología*, 4th ed., España, Addison Wesley, 2002, pp. 97-106.
- [23] H. Curtis, Barnes, A. Schnek y A. Massarini, «Biología de las plantas,» de *Biología*, Séptima ed., Editorial Médica Panamericana, 2008, pp. 680-686.

- [24] G. M. Gadd, «Interactions of fungi with toxic metals,» *New phytology*, vol. 124, pp. 25-60, 1993.
- [25] B. Pernía, A. De Sousa, R. Reyes y M. Castrillo, «Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas,» *Interciencia*, vol. 33, n° 2, pp. 112-119, Febrero 2008.
- [26] S. Veraguas, «Función de micronutrientes,» de *Memorias: seminario técnico - Fertilización forestal*, CATIE-INRENARE, 1995, pp. 72-76.
- [27] A. Ronco, Díaz y M. Consuelo, «Interpretación de resultados,» de *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas*, Primera ed., G. Castillo, Ed., Ottawa, Instituto mexicano de tecnología del agua, 2004, p. 147.