

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Papel de los hongos simbióticos asociados a la rizósfera de  
*Phragmites australis* en la solubilización de fosfato en presencia  
de metales.**

**T E S I S**

Que presenta

**JOSÉ ROBERTO ZÚÑIGA SILVA**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Directores de la Tesis: **Dra. Refugio Rodríguez Vázquez**

**Dr. Octavio Loera Corral**

**México, D.F.**

**Noviembre, 2015**

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo de **CONACYT** a través de la beca de doctorado.

## COMITÉ TUTORIAL



Dra. Refugio Rodríguez Vázquez (Directora)

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV - IPN

rrodrig@cinvestav.mx



Dr. Octavio Loera Corral (Co- Director)

Departamento de Biotecnología. UAM - Iztapalapa

loera@xanum.uam.mx



Dra. Beatriz Xoconostle Cázares (Asesora)

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV - IPN.

bxoconos@cinvestav.mx



Dr. Ricardo Aguilar López (Asesor)

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV - IPN.

raguilar@cinvestav.mx



Dra. María Eugenia Hidalgo Lara (Asesora)

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV - IPN.

ehidalgo@cinvestav.mx



Dr. Enrique Alarcón Gutiérrez (Asesor)

Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada. INBIOTECA - UV

enalarcon@uv.mx

# DEDICATORIA

## **A mi Madre:**

*María Cecilia Silva Soto*

*Por darme la vida y por todo el apoyo que me ha brindado.*

## **A mis Hermanos:**

*Martín y Daniel*

*Quienes siempre han sido un impulso para seguir adelante.*

## **A mi Abuela:**

*Ofelia Soto Ortega*

*Por siempre estar al pendiente de mí*

## **En Memoria**

*A aquellos que no alcanzaron a ver la culminación de este trabajo*

*A mi primer codirector el Dr. Peter Kuschik*

*A mi papá adoptivo Martín Pérez Cruz*

# AGRADECIMIENTOS

Gracias DIOS, este camino fue sinuoso y siempre encontré consuelo en las personas que colocaste en mi camino.

- **A quienes dirigieron este trabajo:**

A la Dra. Refugio Rodriguez Vázquez, por toda la confianza que siempre me ha brindado, gracias por todo el apoyo para concluir en tiempo y forma este proyecto, gracias por todas sus atenciones, los dulces después de las seis y los raites a casa cuando salía muy tarde, gracias además por su amistad y por la motivación para convertirme en investigador.

Al Dr. Octavio Loera Corral, por todo el apoyo que me ha brindado desde siempre, por todas las observaciones, comentarios que han enriquecido este trabajo, gracias por todo el apoyo moral y los consejos que me ha brindado los cuales han marcado el desarrollo de este trabajo y han sido importantes también para mi desarrollo personal y profesional, es un verdadero honor contar con su amistad.

En memoria del Dr. Peter Kuschk, a quien conocí recién iniciado este proyecto, gracias por todas sus atenciones, sus consejos, las pláticas de Skype aquellas en las que discutíamos temas del proyecto y aquellas que solo eran para saludar, gracias por todo el apoyo que me brindó en los momentos más difíciles de este proyecto, gracias también por ayudarme a mejorar mi alemán. "Vielen Dank für alles, mein lieber Peter"

- **A quienes asesoraron este proyecto:**

A la Dra. Beatriz Xoconostle y al Dr. Ricardo Aguilar quienes participaron desde el inicio de este proyecto, por todo el apoyo que me han brindado y por sus atinados comentarios realizados en cada examen tutorial, gracias a la Dra. Maria Eugenia Hidalgo Lara por complementar el comité tutorial y por el apoyo para concluir este proyecto.

En especial muchas gracias al Dr. Enrique Alarcón Gutiérrez por su incorporación al comité tutorial, por todos sus comentarios y el apoyo brindado para concluir con éxito mi proyecto de doctorado.

- **Al Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV.**

Gracias a la Dra. Emma Gloria Ramos Ramírez por el apoyo brindado desde la coordinación académica, gracias también a Vania Muñoz por todo el apoyo en cada uno de los trámites, gracias a todos los investigadores que conforman el departamento de Biotecnología y Bioingeniería, gracias en particular al Dr. Jaime Ortega.

- **A mi Familia:**

Mi tios Araceli Silva, Luis Tejeda, Aarón Silva y Rogelio Silva por toda la motivación, gracias en especial a mis tios Rosalba Silva y Jose Luis Sánchez por todo el apoyo que me han brindado, por permitirme tener un lugar a donde llegar durante el tiempo que estuve realizando mis estudios de doctorado.

A mis primos Edgar, Monse, Paola, Jose Luis y Rogelio, siendo yo el primo mayor espero ser una motivación para ustedes en el desarrollo de su carrera profesional.

- **A mis compañeros de Laboratorio:**

Natalia Tapia, Alejandro Islas, Dante Camarillo, Adriana Ramírez, Janet Urbina, Lolis Diaz gracias por todos estos años de excelente amistad y por toda la motivación y apoyo.

A Wilberth Chan por su amistad y por compartir conmigo excelentes ideas, gracias por todo lo que he aprendido de él y por la motivación para poder retomar el proyecto cuando las cosas no estaban saliendo bien, gracias por haberme convencido de ir a Veracruz en busca de las micorrizas y por ayudarme con todos los muestreos, gracias por hablarme de los solubilizadores de fósforo y generar en mi esa inquietud y por ser mi coach para la escritura de mis artículos científicos.

A la Dra. Martha Barajas por todo su apoyo técnico para la determinación de metales pesados, y por todas las pláticas que compartimos en el laboratorio, por todos los consejos que me brindó y por su amistad.

Al Sr. Tomás Hernández por todo el apoyo técnico, a las secretarias Lulú y Alejandra Sinencio por todo el apoyo administrativo.

A mis “sobrinitos” Fer Romo, Anlui Rodriguez, Fernando Palomares y Ceres del Rosario Pérez Vargas por todos los buenos momentos de convivencia en el laboratorio 44.

A mis alumnos con quienes compartí parte de este proyecto, gracias Paulina Balderas, Sergio Gómez, José Tafur, Ian Chávez, Fernanda Figueroa y Dianyss Linares.

A Héctor Hugo León, quien se incorporó al lab en la recta final de este proyecto, justo cuando me sentí solo en el lab, gracias por su amistad y por todas las sobremesas que compartimos, también a Fabiola Gómez porque todas sus aventuras han contribuido a mantener la alegría dentro y fuera del laboratorio.

- **A mis colegas:**

A Guillermo Quijano, Ivonne Figueroa, Gastón Martínez, Alma Toledo, Carlos Escamilla, Guadalupe Paredes, Karla Muñoz Paez, Jaime López Luna, Óscar Rojas, Pablo López, con quienes inicié esta aventura del posgrado y que me han brindado siempre su amistad y me han motivado a continuar con mi formación profesional. A mis compañeros de generación de doctorado Luz Bretón, Javier Acuapan y en especial a Giovanni Hernández por todo el camino que hemos recorrido juntos.

- **A mis compañeros de trabajo de la UTTEC:**

Erika Villeda, Eduardo Rodríguez, Claudia Claverie, Edith Ramírez, Bianca Ortega de la Mora por siempre motivarme a realizar mi doctorado y por todos los buenos momentos que pasamos trabajando juntos.

- **A mis cuates**

Un agradecimiento muy especial a mis amigos no biotecnólogos y con los que he compartido esta aventura, gracias Adrián Cholico, Martha Peñaloza, Iñaki Juárez, Job Ahmed Acosta, Rodolfo Ruíz, Jesús Ricardi, Juan Omar Sosa, Braulio Santamaria y su esposa Elvira Ortega.

Gracias también a todos aquellos que formaron parte de este proyecto y que estuvieron presentes en este camino.

## INDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>10</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>11</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>7</b>
2.1 <i>Contaminación del agua</i>	7
2.1.1 Eutrofización	8
2.1.2 Metales Pesados	9
2.2 <i>Fitorremediación</i>	10
2.2.1 Rizadorremediación	11
2.3 <i>Microorganismos Rizósfericos</i>	13
2.3.1 Hongos Micorrízicos Arbúsculares	13
2.3.2 Hongos solubilizadores de fosfato	14
2.4 <i>Phragmites australis</i>	15
2.4.1 <i>Remoción de Fósforo</i>	18
2.4.2 <i>Asimilación de metales</i>	19
2.4.3 <i>Microorganismos Rizósfericos</i>	20
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>21</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>22</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>24</b>
6.1 <i>Muestreo</i>	25
6.1.1 Sitio de muestreo	25
6.1.2 Recolección de muestras	26
6.1.3 Propagación de Plantas	27
6.1.4 Análisis Físicoquímico	29
6.1.5 Caracterización Microbiológica	29
6.2 <i>Caracterización Micorrízica</i>	30
6.2.1 Cultivos Trampa	30
6.2.2 Extracción de Esporas y Cuantificación	31
6.2.3 Procedimientos de Tinción de Raíces	32
6.2.4 Evaluación de Colonización de Raíces	33
6.3 <i>Hongos Solubilizadores de Fosfato</i>	34
6.3.1 Aislamiento de Hongos Solubilizadores de Fosfato	34
6.3.2 Medio Pikowskaya	34
6.3.3 Aislamiento de Hongos Rizósfericos	35
6.3.4 Identificación Molecular de los hongos (Género y Especie)	35

6.4 <i>Ensayo Dosis Respuesta</i>	36
6.4.1 Parámetros de Crecimiento	36
6.4.2 Parámetros Toxicológicos	37
6.5 <i>Experimentos en Medio Líquido</i>	37
6.6 <i>Métodos Analíticos</i>	38
6.6.1 Determinación de la Solubilización de Fosfato	38
6.6.2 Peróxido de Hidrógeno	38
6.6.3 Determinación de Ácidos Orgánicos	39
6.6.4 Proteína y Cuantificación de Biomasa	39
6.6.5 Actividad Fosfatasa	40
6.6.6 Diseño Experimental	41
6.7 <i>Experimentos Hidropónicos</i>	41
6.7.1 Ensayo de Toxicidad	41
6.7.2 Parámetros Bioquímicos	43
6.8 <i>Sistema Hidropónico</i>	44
6.8.1 Dosificación de metales	45
6.8.2 Ensayo de Co-inoculación	45
6.8.3 Análisis de Plantas	47
6.8.4 Análisis de Raíces	47
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>48</b>
7.1 <i>Etapa 1 Caracterización Rizosférica</i>	48
7.1.1 Características de Agua y Sedimentos	48
7.1.2 Hongos Micorrízicos	49
7.1.3 Hongos Solubilizadores de Fosfato	52
7.2 <i>Ensayos In Vitro</i>	53
7.2.1 Solubilización de fosfato en caja Petri	53
7.2.2 Solubilización de fosfato en líquido	55
7.2.3 Ensayo Dosis- Respuesta	63
7.2.4 Determinación de Concentración Efectiva Media (CE <sub>50</sub> )	71
7.2.5 Índice de Tolerancia	74
7.2.6 Índice de Solubilización de Fosfato	76
7.2.7 Peróxido de Hidrógeno y Solubilización de Fosfato	78
7.2.8 Efecto de la suplementación de nutrientes sobre la solubilización de fosfato	87
7.3 <i>Experimentos Hidropónicos</i>	99
7.3.1 Fitotoxicidad de metales	99
7.3.2 Ensayo de Dosificación	105
7.3.3 Ensayo de Coinoculación	113
<b>8. Conclusiones</b>	<b>118</b>
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	<b>120</b>
<b>10. REFERENCIAS</b>	<b>121</b>
<b>11. Anexos</b>	<b>144</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Procesos de Fitorremediación 11
Figura 2	Raíces de las Plantas 12
Figura 3	Morfología de <i>Phragmites australis</i> 16
Figura 4	Mapa de la región donde se localizan las lagunas La Mancha, El Farallón, El Llano y el Centro de Investigaciones costeras La Mancha (CICOLMA). 26
Figura 5	Criterios de muestreo 27
Figura 6	Método de agitación y decantación 31
Figura 7	Sistema hidropónico utilizado en los ensayos de dosificación 44
Figura 8	Porcentajes de colonización en las muestras obtenidas del sitio evaluado. 49
Figura 9	Macetas de cultivos trampas utilizando sorgo ( <i>Sorghum sp.</i> ) 50
Figura 10	Criterio cualitativo de identificación de esporas de hongos micorrizicos 50
Figura 11	Hongos saprobios aislados del suelo rizósferico de <i>P. australis</i> 52
Figura 12	Producción de ácidos oxálico, cítrico y glucónico 60
Figura 13	Actividades de fosfatasa para cuatro cepas fúngicas 62
Figura 14a	Ensayo Dosis – Respuesta para $Cd^{2+}$ , $Cr^{3+}$ y $Cr^{6+}$ 64
Figura 14b	Ensayo Dosis – Respuesta para $Al^{+3}$ , $Co^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Pb^{2+}$ y $Zn^{2+}$ 64
Figura 15	Índice de Tolerancia de cinco cepas de fúngicas aisladas de la rizósfera de <i>Phragmites australis</i> en presencia de metales 75
Figura 16	Índice de solubilización de fosfato de cuatro cepas fúngicas 77
Figura 17	Solubilización de fosfato (A) y Producción de $H_2O_2$ (B) 79
Figura 18	Análisis gráfico de la interacción $Cd^{+2}$ y extracto de levadura para la solubilización de fosfato 81
Figura 19	Análisis gráfico de la interacción A) $Cd^{+2}$ y extracto de levadura, B) Cadmio y Glucosa para la producción de biomasa 84
Figura 20	Análisis gráfico del modelo ajustado 85
Figura 21	Efecto de varios factores evaluados sobre la actividad de la fosfatasa 95
Figura 22	Efectos significativos de los factores evaluados en la producción de peróxido de hidrógeno 97
Figura 23	Efecto fitotóxico ejercido por el cadmio y el plomo sobre plantas juveniles de <i>Phragmites australis</i> a cinco diferentes concentraciones de metal 99
Figura 24	Cuantificación de clorofila a diferentes tiempos de exposición a cada concentración. 102
Figura 25	Porcentaje de Inhibición por $Cd^{2+}$ y $Pb^{2+}$ en el crecimiento (altura y longitud radical) de <i>Phragmites australis</i> 106
Figura 26	Porcentaje de Inhibición por $Cd^{2+}$ y $Pb^{2+}$ en el crecimiento (altura y longitud radical) de <i>Phragmites australis</i> 108
Figura 27	Crecimiento (Altura y Raíces) para cada tratamiento en presencia de $Cd^{2+}$ 113
Figura 28	Asimilación de fosfato para cada tratamiento en presencia de $Cd^{2+}$ 115

## ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Características de <i>Phragmites australis</i> – (Cav.) Trin. ex Steud	17
Tabla 2	Solución nutritiva Long Ashton	28
Tabla 3	Análisis fisicoquímico aplicado a muestras de agua y sedimentos	29
Tabla 4	Composicion del agua residual sintética	42
Tabla 5	Contenido de metales en el sitio de muestreo	48
Tabla 6	Abundancia de Esporas detectadas a través del método cualitativo / cuantitativo	51
Tabla 7	Fósforo soluble y pH en el medio líquido con Ca-P y Fe-P	56
Tabla 8	Correlación entre porcentaje de fósforo soluble y pH en medio líquido	57
Tabla 9a	Efecto de las concentraciones de cadmio y el cromo sobre el crecimiento de <i>Trichoderma atroviride</i>	65
Tabla 9b	Efecto de las concentraciones de cadmio y el cromo sobre el crecimiento de las cepas del género <i>Penicillium</i>	66
Tabla 9c	Efecto de las concentraciones de cadmio y el cromo sobre el crecimiento de las cepas del género <i>Aspergillus</i>	66
Tabla 10a	Efecto de varias concentraciones de metales sobre el crecimiento vegetativo de <i>Trichoderma atroviride</i>	67
Tabla 10b	Efecto de varias concentraciones de metales sobre el crecimiento vegetativo de cepas de <i>Penicillium</i>	68
Tabla 10c	Efecto de varias concentraciones de metales sobre el crecimiento vegetativo de cepas de <i>Aspergillus</i>	69
Tabla 11a	Concentración efectiva media para Cd <sup>2+</sup> , Cr <sup>3+</sup> y Cr <sup>6+</sup>	72
Tabla 11b	Concentración efectiva media para cada metal	73
Tabla 12	Valores para solubilización de fosfato, peróxido de hidrógeno y producción de biomasa por <i>P. italicum</i>	81
Tabla 13	Análisis ANOVA para la solubilización de fosfato por <i>Penicillium italicum</i>	82
Tabla 14	Análisis ANOVA para la producción de biomasa por <i>Penicillium italicum</i>	83
Tabla 15a	Crecimiento de cuatro cepas evaluadas bajo estrés por Cd <sup>2+</sup> en medio Pikowskaya con P-Ca	88
Tabla 15b	Crecimiento de cuatro cepas evaluadas bajo estrés por Cd <sup>2+</sup> en medio Pikowskaya con P-Fe	89
Tabla 16	Concentración efectiva media (CE <sub>50</sub> ) obtenida a través de un ensayo dosis respuesta	90
Tabla 17	Eficiencia de solubilización (%) obtenido despues de cinco días de incubación	92
Tabla 18	Modelos obtenidos para el fósforo soluble después de cinco días de incubación	93
Tabla 19	Análisis Probit para altura y longitud radical de <i>P. australis</i> creciendo en una agua sintética suplementada con metales Cd y Pb	100
Tabla 20	Parámetros Bioquímicos evaluados en el ensayo fitotóxico	103
Tabla 21	Acumulación de Cd y Pb en parte aérea, raíces y biomasa total de plantas de <i>P. australis</i> de 95 díaa	110
Tabla 22a	Acumulación de metales en los tratamientos con fosfato tricálcico	111
Tabla 22b	Acumulación de metales en los tratamientos con fosfato férrico	112
Tabla 23	Acumulación de Metales en los tratamientos con inoculación dual, inoculación con micorriza, inoculación con hongo solubilizador de fosfato y sin inoculación	116

## RESUMEN

En los procesos de tratamiento de aguas residuales por sistemas de humedales, para la remoción de metales pesados se desconoce el papel de microorganismos, tales como los hongos micorrízicos y los hongos asociados al suelo rizosférico, en presencia de fosfatos insolubles. Puesto que el fósforo es un nutriente esencial en el metabolismo de las plantas acuáticas como el *Phragmites australis*, especie vegetal que ha sido utilizada ampliamente en los sistemas de humedales, debido a sus características de adaptación bajo condiciones ambientales extremas. Por lo que en este trabajo se investigó el papel de los hongos asociados a la rizósfera de *P. australis* en la solubilización de fosfato tricálcico, (P-Ca) y fosfato férrico, (P-Fe), en presencia de metales.

Este proyecto comprendió dos etapas, la primera efectuada a nivel laboratorio, cuyo objetivo fue el determinar la habilidad de un consorcio micorrízico y cinco cepas fúngicas en la solubilización de P-Ca y P-Fe, bajo condiciones *in vitro* utilizando el medio Pikowskaya, en cultivo sólido para los ensayos cualitativos y en líquido para los ensayos cuantitativos. Los hongos aislados de suelos rizosféricos de *Phragmites australis* fueron identificados hasta género y especie a través de técnicas moleculares basadas en la amplificación de las regiones ITS4 e ITS5, las cuales corresponden a: *Penicillium italicum*, *Penicillium dipodomyicola*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* y *Trichoderma atroviride*. Se determinó que las cepas evaluadas presentaron una mayor capacidad para solubilizar P-Ca en comparación con P-Fe; *T. atroviride* registró el diámetro de crecimiento micelial más rápido ( $1.48 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$ ), mientras que *P. italicum* y *P. dipodomyicola* mostraron los mayores índices de solubilización de fosfato en medio sólido 1.97 y 2.12 respectivamente, además *P. italicum* registró el mayor porcentaje de solubilización (99.88 %).

A través de ensayos dosis respuesta se evaluó el efecto de metales como; aluminio, cadmio, níquel, zinc, plomo, cobalto, cobre, cromo trivalente y cromo hexavalente sobre el crecimiento y capacidad de solubilización de fosfato en medio sólido. Las cepas de *Penicillium* y *Aspergillus* fueron seleccionadas para evaluar el efecto de la glucosa y el nitrógeno sobre la capacidad de solubilización de fosfato en presencia de  $\text{Cd}^{2+}$ , P-Ca y P-Fe, a través de un diseño factorial  $2^4$  con puntos centrales. El Cd fue seleccionado, debido a su mayor toxicidad, teniendo *P. dipodomyicola* los valores más altos de  $\text{CE}_{50}$ ; 0.46 mM para P-Ca y 0.62 mM para P-Fe. Los factores de mayor impacto ( $p < 0.05$ ) sobre la solubilización de fosfato fueron glucosa ( $F = 18.42$ ;  $p = 0.002$ ) y sulfato de amonio ( $F = 14.57$ ;  $p = 0.004$ ), por lo que las cepas de *Penicillium* mostraron la mejor capacidad de solubilización de fosfato bajo condiciones de estrés.

La segunda etapa realizada a nivel invernadero, tuvo como objetivo, determinar el efecto de la interacción entre el consorcio micorrízico y los hongos solubilizadores de fosfato, en la asimilación de fosfato y en la acumulación de metal en los tejidos de *P. australis*. Como inóculo se utilizó el consorcio micorrízico y la cepa de *P. italicum*, debido a que este hongo incrementó la colonización micorrízica en comparación con los ensayos individuales. El análisis estadístico mostró que los factores significativos ( $p < 0.05$ ) para la asimilación de fosfato, fueron; el tipo de tratamiento ( $F_0 = 39.78$ ;  $P < 0.0001$ ), tipo de fosfato ( $F_0 = 33.73$ ;  $P < 0.0001$ ), así como la interacción entre factores ( $F_0 = 33.07$ ;  $P < 0.0001$ ). La inoculación dual incrementó la acumulación de metales en la raíz ( $64.11 \mu\text{g Cd}^{+2} \text{ gPlant}^{-1}$ ), sin embargo, limita la acumulación en los tejidos superiores de la planta. Los resultados muestran el papel de los hongos simbióticos en este tipo de sistemas de humedales, puesto que participan en la nutrición y además confieren tolerancia a la presencia de elementos potencialmente tóxicos.

## ABSTRACT

In the waste water treatment process by wetland systems for heavy metals removal, it is unknown the role of microorganisms, such as mycorrhizal fungi and fungi associated with the rhizospheric soil, in the presence of insoluble phosphate. Since phosphorus is an essential nutrient for the metabolism of aquatic plants such as with *Phragmites australis*, a vegetal specie that has been widely used in wetland systems, due to their adaptive characteristics under extreme environmental conditions. Therefore, in this work it was investigated the role of fungi associated with the rhizosphere of *P. australis* in solubilization of tricalcic phosphate (P-Ca) and ferric phosphate (P-Fe), in the presence of metals.

This work comprises two stages; the first was performed at laboratory scale, whose goal was to determine the ability of mycorrhizal consortium and five fungal strains to solubilize P-Ca and P-Fe, under in vitro conditions, using Pikowskaya medium in solid culture for qualitative and liquid for quantitative tests. Fungi isolated from *Phragmites australis* rhizosphere soil, were identified to genus and species using molecular techniques based on the amplification of ITS4 and ITS5 regions, which correspond to: *Penicillium italicum*, *Penicillium dipodomyicola*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* and *Trichoderma atroviride*. It was determined that the evaluated strains have a greater capacity for solubilizing tricalcium phosphate (Ca-P) compared with ferric phosphate (P-Fe); *T. atroviride* recorded the fastest mycelial growth diameter ( $1.48 \text{ cm}^2 \text{ day}^{-1}$ ); while *P. italicum* and *P. dipodomyicola* showed the highest rates of phosphate solubilization in solid medium 1.97 and 2.12 respectively, and *P. italicum* recorded higher solubilizing percentage (99.88%).

Through dose-response trials, the effect of metals such as aluminum, cadmium, nickel, zinc, lead, cobalt, copper, trivalent chromium and hexavalent chromium on fungal growth and phosphate solubilizing capacity on solid medium was evaluated. The strains *Penicillium* and *Aspergillus* were selected to evaluate the effect of glucose and nitrogen on their ability for phosphate solubilizing capacity in the presence of  $\text{Cd}^{2+}$  of P-Ca and P-Fe, through a  $2^4$  factorial design with central points. The metal  $\text{Cd}^{2+}$  was chosen, because of their greater toxicity, having *P. dipodomyicola* higher values of  $\text{EC}_{50}$ ; 0.46 mM for P-Ca and 0.62 mM for P-Fe. The factors with the greatest impact ( $p < 0.05$ ) on the phosphate solubilization were; glucose ( $F = 18.42$ ;  $p = 0.002$ ) and ammonium sulphate ( $F = 14.57$ ;  $p = 0.004$ ), so *Penicillium* strains showed the best phosphate solubilization capacity under stress conditions.

The second stage performed at greenhouse, aimed to determine the effect of the interaction between mycorrhizal fungus and phosphate solubilizing fungi on the assimilation of phosphate and metal accumulation in the tissues of *P. australis*. As inoculum the mycorrhizal consortium and the *P. italicum* strain were used, because this fungus increased the mycorrhizal colonization in comparison with the individual trials. The statistical analysis allow to determine the significant factors for phosphate assimilation, and were; the type of treatment ( $F_0 = 39.78$ ;  $P < 0.0001$ ), phosphate type ( $F_0 = 33.73$ ;  $P < 0.0001$ ) and the interaction between factors ( $F_0 = 33.07$ ;  $P < 0.0001$ ), with dual inoculation, the accumulation of metals in root increases ( $64.11 \mu\text{g Cd}^{+2} \text{ gPlant}^{-1}$ ), however it limits the accumulation in higher plant tissues. The results show the role of symbiotic fungi in this type of wetland systems, since are involved in nutrition and also confer tolerance to the presence of potentially toxic elements.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las descargas de aguas residuales contienen una amplia gama de compuestos orgánicos e inorgánicos e inclusive en compuestos de origen natural, en una concentración inusualmente alta por lo que presentan efectos ambientales perjudiciales (Imfeld *et al.*, 2009), ejemplo de esto sucede con nutrientes como fósforo (P) o el nitrógeno (N), los cuales son elementos indispensables para el funcionamiento óptimo de los ecosistemas, sin embargo su exceso, es la causa principal de la eutrofización de los medios acuáticos. (Bennett *et al.*, 2001). Desde la pre-revolución industrial y debido a las actividades antropogénicas, el ciclo del fósforo, se ha alterado de tal manera que los niveles se han incrementado por encima del ciclo biogeoquímico natural; por lo tanto, el P se ha convertido en un contaminante ambiental en océanos, lagos y ecosistemas acuáticos en general (Vymazal, 2007). La entrada principal del fósforo en el medio ambiente se produce por diversos medios, como son la gran aplicación de fertilizantes fosfatados y por las aguas residuales que son descargados a los diversos cuerpos receptores de agua. La remoción de fósforo en los sistemas de tratamiento de aguas residuales, es un tema de interés que no ha sido lo suficientemente atendido (Kadlec y Wallace, 2008), mientras que en los suelos la entrada de fósforo puede ser regulada a través de una fertilización balanceada (Sharpley y Tunney, 2000). Las descargas de aguas residuales requieren de un tratamiento adecuado para la remoción de fósforo, para con ello evitar los procesos de eutrofización en los ambientes acuáticos.

Por otra parte, la problemática de contaminación en aguas residuales se complica debido a la presencia de elementos potencialmente tóxicos; como el caso de metales pesados, los cuales entran en los ecosistemas naturales a través de las descargas de aguas residuales de tipo municipal e industrial o por medio de la deposición atmosférica (Marchand *et al.*, 2010), lo cual aumenta su concentración en el medio ambiente, la principal dificultad en el tratamiento de las aguas residuales que contienen metales pesados se debe al hecho de que no pueden ser removidos o degradados.

Uno de los métodos utilizados para la remoción de contaminantes es por medio de tecnologías naturales ancestrales, como lo son los humedales, que hoy en día son tecnologías que por su sustentabilidad está cobrando gran interés. Los humedales son considerados como una alternativa a los métodos convencionales para el tratamiento de aguas residuales además de ser una tecnología de bajo costo y amigable con el medio ambiente, debido a su eficacia han sido utilizados mundialmente para el tratamiento de aguas municipales e industriales (Baptista *et al.*, 2008) y para la remoción de nutrientes como nitrógeno y fósforo (Vymazal, 2007); el término "humedales" se refiere a la zona de transición entre los sistemas terrestres y acuáticos, con suelos anegados o temporalmente saturados durante al menos un periodo de tiempo, con la presencia de especies de plantas propias de este ecosistema (Williams, 2002). Los humedales constan de cuatro elementos principales: las plantas principalmente macrofitas y helofitas, el soporte que consiste en suelo, y/o sedimentos, la presencia de microorganismos presentes en el agua y asociados a la rizósfera, además de una fase acuosa, en la que existe un exceso de nutrientes o donde se encuentran elementos potencialmente tóxicos (Faulwetter *et al.*, 2009).

Las plantas que habitan en los humedales son capaces de tolerar altas concentraciones de metales y en algunos casos incluso a acumularlos en sus tejidos. (Liu *et al.*, 2007), sin embargo la asimilación de metales pesados es capaz de afectar la fisiología y el metabolismo de asimilación de nutrientes esenciales (Papoyan *et al.*, 2007). Los micronutrientes esenciales (Ni, Zn, Cu) son componentes básicos para el desarrollo de las plantas, pero en concentraciones altas tienen un efecto potencialmente tóxico. Los metales no esenciales como el cadmio (Cd) y plomo (Pb) pertenecen a los contaminantes generados en zonas urbanas e industriales, y que pueden ser asimilados por las plantas a través de raíces y tallos, las concentraciones más altas de Pb se han observado en las raíces, mientras que cantidades bajas son transportadas a otras partes de las plantas (Verma y Dubey 2003), en contraste el Cd pertenece a los elementos capaces de ser translocado a través de los tejidos de la plantas y acumularse en las hojas (Fediuc y Erdei 2002).

Los microorganismos son considerados uno de los factores más importantes que influye directamente en la transformación y mineralización de los compuestos xenobióticos, incluso se les atribuye una mayor participación en el proceso de remoción en comparación con las plantas (Vacca *et al.*, 2005). Los principales mecanismos de eliminación de nutrientes de las aguas residuales en los humedales son procesos microbianos que se llevan a cabo a través de la interacción entre plantas y microorganismos (Stottmeister *et al.*, 2003). Las interacciones rizósfericas entre plantas y microorganismos traen consigo numerosos beneficios tales, como influencia en el crecimiento radical, regulación de la actividad metabólica e influencia en las propiedades físicas y químicas del entorno, así como de los contaminantes (Ortega - Larrocea *et al.*, 2010), estas interacciones participan además en los ciclos de nutrientes. A pesar de la evidencia experimental limitada, se considera que la capacidad de remoción de contaminantes de la planta está influenciada en gran medida por la estructura de sus comunidades microbianas asociadas a la rizósfera (Weber *et al.*, 2008), aunque también es posible que la naturaleza de las aguas residuales tenga influencia sobre los patrones de colonización microbianos en la rizósfera.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Contaminación del agua

Las condiciones eutróficas de los cuerpos de agua se asocian frecuentemente con la contaminación por metales (López-Flores *et al.*, 2003), debido a que los ecosistemas acuáticos son el receptor final de las descargas de aguas residuales, efluentes industriales, escorrentías provenientes de actividades agrícolas y mineras. El tratamiento actual de aguas residuales utiliza varios métodos para eliminar el fósforo, según de-Bashan y Bashan (2004), los procesos para la eliminación de fósforo de los efluentes de aguas residuales incluyen la precipitación química con elementos como hierro (Fe), aluminio (Al) o calcio (Ca) (Dueñas *et al.*, 2003); la remoción de fósforo suele ser obligatoria antes de la descarga, sin embargo no se realiza y conduce a una fuente de contaminación importante, por otra parte, las principales fuentes de contaminación de metales pesados en los ecosistemas acuáticos provienen de actividades antropogénicas y

esta contaminación puede ser tratada utilizando una variedad de tecnologías que incluyen procesos físicoquímicos; entre los cuales se tienen, la sedimentación, decantación, filtración, adsorción, precipitación, y co-precipitación en compuestos insolubles (Sheoran y Sheoran, 2006), por otra parte también se han implementado procesos biológicos como es el caso de la fitorremediación (Arthur et al., 2005). Por lo general los ambientes acuáticos son perturbados por más de un tipo de estresor (Ivorra *et al.*, 2002), y los contaminantes presentes en el ambiente pueden interactuar con diversos factores abióticos y bióticos (Heugens *et al.*, 2001), aunque la eutrofización y la contaminación por metales pesados han sido ampliamente investigados, ambos temas han sido tratados por separado; por lo que para entender mejor el impacto de la contaminación en los ecosistemas acuáticos es extremadamente importante dilucidar la interacción entre el metal y los nutrientes presentes.

---

### **2.1.1 Eutrofización**

La excesiva carga de nutrientes es uno de los problemas ambientales que afecta la calidad del agua (Howarth 2008); el crecimiento demográfico y el correspondiente desarrollo urbano ha incrementado la contaminación en los cuerpos acuáticos, las descargas de aguas residuales junto con los cambios en las prácticas agrícolas, han dado lugar a un aumento de las concentraciones de nutrientes en las aguas de ríos y estuarios, particularmente de nitrógeno y fósforo (Umezawa *et al.*, 2008). La eutrofización es un tipo de proceso que implica el enriquecimiento de nutrientes en los ambientes acuáticos, que se traduce en un crecimiento excesivo e indeseable de algas y plantas acuáticas. Este fenómeno reduce la penetración de la luz y restringe la re-oxigenación del agua por lo que la eutrofización es uno de los tipos graves de contaminación del agua que afectan directamente a la flora y fauna debido a la pérdida de oxígeno disuelto (Carpenter, 2005). A pesar de que es un proceso natural, el proceso de eutrofización de ambientes acuáticos se ha acelerado debido a las actividades antropogénicas mediante el aumento de la entrada de nutrientes en los cuerpos de agua (Khan y Ansari, 2005).

Se ha demostrado que el enriquecimiento de nutrientes influye en todos los niveles tróficos dentro de un ecosistema, particularmente en la abundancia, desplazamiento o pérdida de biodiversidad así como en los cambios en la estructura y composición de las comunidades bióticas. (Piceno y Lovell, 2000; Álvarez-Cobelas *et al.*, 2001; Guntenspergen *et al.*, 2002). Los nutrientes y en particular nitrógeno, fósforo y la materia orgánica procedentes de diversas fuentes son las principales causas de la eutrofización y por ende la degradación de los ecosistemas acuáticos (Khan y Ansari, 2005). El exceso de carga de fósforo altera el equilibrio competitivo entre las distintas especies de plantas acuáticas presentes en el ecosistema, incluyendo tanto las plantas superiores como las algas (Mainstone y Parr, 2002).

El fósforo es un elemento esencial para la nutrición de las plantas y que sólo se puede asimilar como fosfato soluble, el fósforo sólo está presente en estado completamente oxidado en forma de fosfato que forma complejos de sales insolubles con elementos como el Ca, Fe y Al (Sashidhar y Podile , 2010); este elemento llega a los ecosistemas acuáticos a través de la aplicación de fertilizantes en campos agrícolas, el uso de detergentes y las descargas de aguas residuales e industriales; bajo condiciones naturales se lleva a cabo la formación de fosfatos insolubles, por lo que su incorporación al sistema de agua es muy lento (Mitsch *et al.*, 2000; Ahn *et al.*, 2001).

---

### **2.1.2 Metales Pesados**

Los metales pesados (Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Niquel (Ni), Plomo (Pb) y Zinc (Zn)) y metaloides (Aluminio (Al), Arsénico (As) y Mercurio (Hg)) son los principales contaminantes en el medio natural debido a su toxicidad, persistencia y bioacumulación. Los metales pesados entran al medio ambiente a partir de fuentes naturales y antropogénicas, las fuentes naturales más importantes son la deposición de metales por procesos de meteorización, erosión y la actividad volcánica, mientras que las fuentes antropogénicas incluyen la minería, fundición, galvanoplastia, el uso de plaguicidas y fertilizantes (fosfatados), así como el uso de biosólidos en la agricultura, los lodos activados y las descargas de aguas urbanas e industriales, (Modaihsh *et al.*,

2004; Chehregani y Malayeri, 2007; Fulekar *et al.*, 2009; Sabiha-Javied *et al.*, 2009; Wuana y Okieimen, 2011).

Los metales pesados generalmente existen en dos fases, una fase disuelta en la columna de agua y una fase particulada adsorbida en los sedimentos (Yang *et al.*, 2014), la biodisponibilidad de los metales pesados se ve afectada por numerosos factores ambientales, especialmente el pH y el potencial redox (Sundareshwar *et al.*, 2003). Se ha reportado que las concentraciones de metales pesados en el agua y el suelo están generalmente correlacionados negativamente con el pH (Samecka-Cymerman y Kempers, 2001).

La estructura de los sedimentos es también uno de los factores más importantes de la composición del suelo que influye sobre la capacidad de asimilación de metales por las plantas presentes en el entorno; la vegetación puede tener una influencia importante en la movilidad iónica del metal mediante la modificación de las condiciones redox, pH y contenido de materia orgánica en la rizósfera (Jacob y Otte, 2003; Weis y Weis, 2004; Reboreda y Caçador, 2007); factores como el tipo de nutrientes, biomasa microbiana, y las concentraciones de otros iones también pueden influir en la capacidad de acumulación de metales por parte de la planta (Dong *et al.*, 2007).

## 2.2 Fitorremediación

La fitorremediación (Figura 1) se refiere a la utilización de las plantas y los microbios del suelo asociados para reducir las concentraciones o los efectos tóxicos de los contaminantes en el ambiente (Ali *et al.*, 2013), las técnicas de fitorremediación que se aplican a la remoción de metales pesados incluyen fitoextracción y fitoestabilización.

- A) Fitoextracción (también conocido como fitoacumulación, fitoabsorción o fitosequestración) es la capacidad de absorción de los metales de la matriz del suelo o el agua a través de las raíces de las plantas y su translocación hacia la biomasa aérea (Sekara *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2006; Rafati *et al.*, 2011).

B) Fitoestabilización o Fitoinmovilización es el uso de ciertas plantas para la estabilización de los contaminantes en los suelos contaminados (Singh, 2012). Esta técnica se utiliza para reducir la movilidad y la biodisponibilidad de los metales en el medio ambiente, evitando así su migración hacia el agua subterránea o de su entrada en la cadena alimentaria (Erakhrumen, 2007).

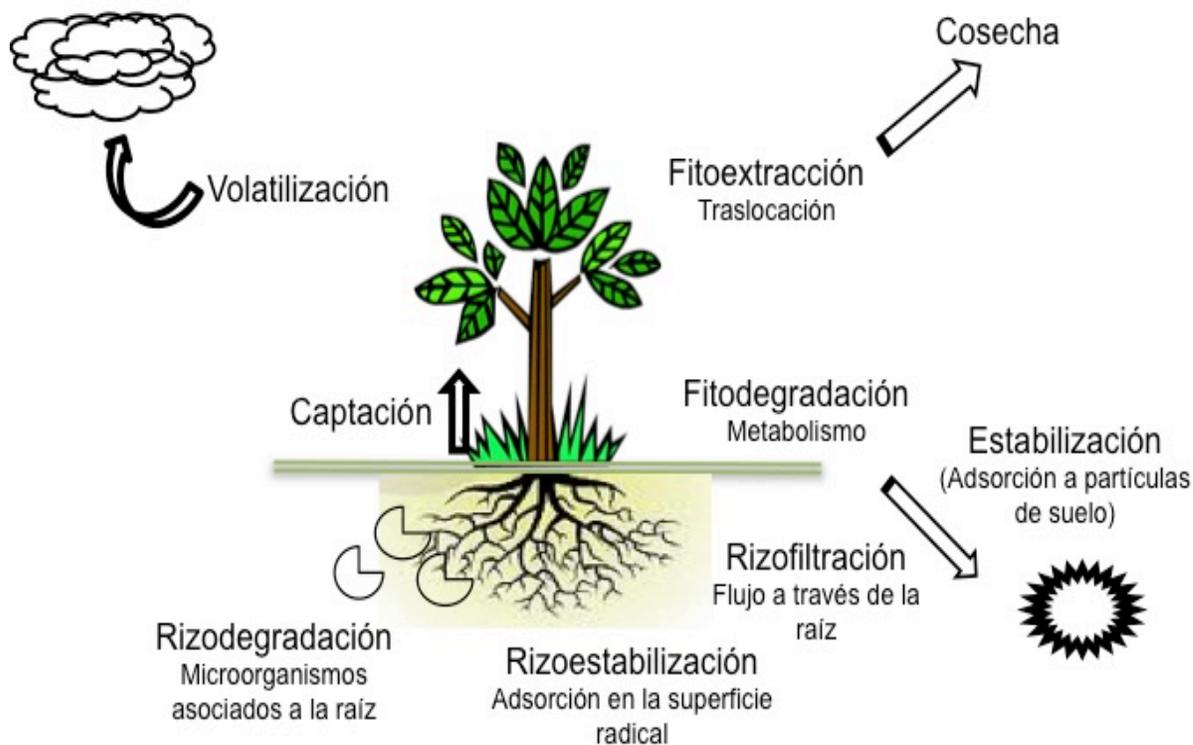


Figura 1. Procesos de Fitorremediación

Las plantas pueden inmovilizar los metales pesados en los suelos a través de absorción por las raíces, la precipitación, formación de complejos o reducción de valencia (Ghosh y Singh, 2005; Yoon *et al.*, 2006).

### 2.2.1 Rizadorremediación

La rizósfera es la zona con mayor actividad metabólica en donde los procesos físicos, químicos y biológicos relacionados con la remoción de contaminantes, mientras que los microorganismos asociados a la rizósfera desempeñan un papel importante en el

bienestar y desarrollo de la planta huésped e incluso juegan un papel crucial en los procesos de tratamiento de aguas residuales (Stottmeister *et al.*, 2003); el término rizósfera fue acuñado originalmente en 1904 (Detmann *et al.*) y puede subdividirse en endorrizósfera o raíz interna y ectorrizósfera o raíz circundante (Toal *et al.*, 2000; Kandeler *et al.*, 2002). La importancia de las interacciones rizosféricas en los ciclos de biogeoquímicos también influye sobre la fisiología y metabolismo de las plantas (Pinton *et al.*, 2001; Weller *et al.*, 2002; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003).

La rizósfera es tanto temporal como espacialmente dinámica (Figura 2), la probabilidad de interacción entre planta y microorganismos aumenta con respecto a la proximidad a la raíz y se extiende incluso en la epidermis de la raíz y las células corticales de la planta (Buée *et al.*, 2009), la rizósfera en si es una expresión de relaciones simbióticas mutuas entre las plantas y los microorganismos, las plantas proporcionan un nicho ecológico para los microorganismos (Bais *et al.* 2006), debido a su estructura de sus raíces y la exudación de compuestos orgánicos principalmente azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos útiles para la colonización microbiana (Jeffries *et al.*, 2003).

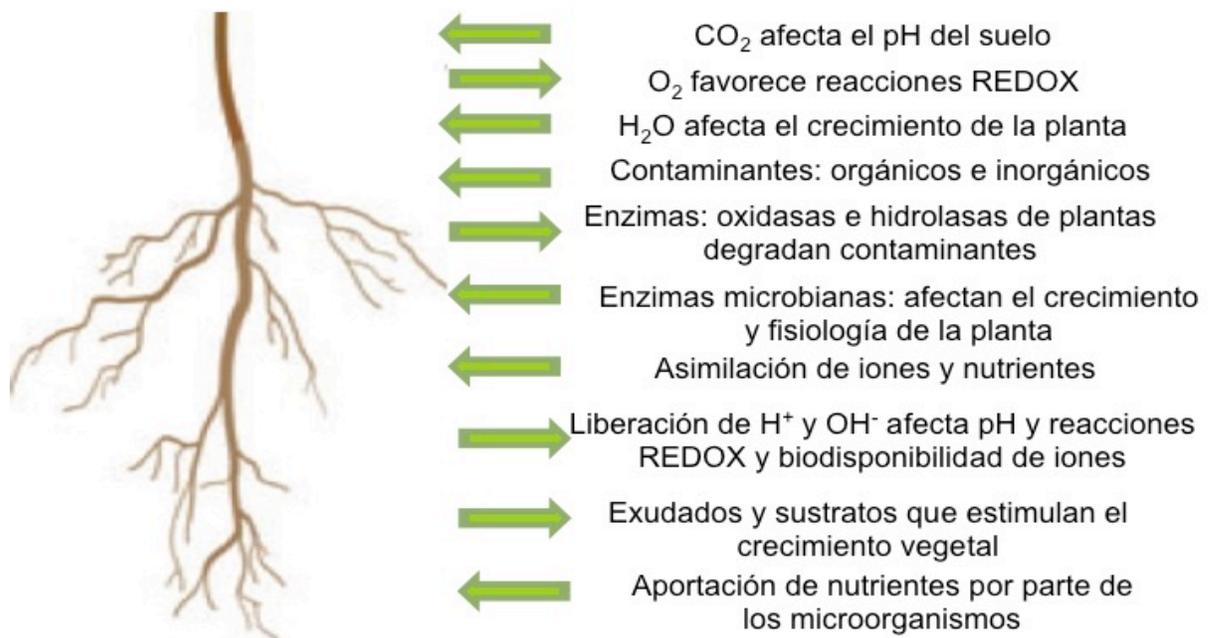


Figura 2 Las raíces de las plantas soportan el crecimiento en la superficie de la raíz y la rizósfera (Tomado de Gerhardt *et al.*, 2009).

De esta forma, la rizósfera induce cambios en la distribución y actividad de los microorganismos asociados a las raíces en comparación con los de suelo, este fenómeno se denomina efecto rizosférico y fue descrito por primera vez por Detmann *et al.*, (1904), quien observó un efecto “estimulante” de las raíces sobre las poblaciones microbianas del suelo y a su vez, los microorganismos rizosféricos tienen influencia sobre las plantas, por lo que han sido aislados e identificados una gran variedad de microorganismos que poseen efectos estimulantes o inhibitorios sobre el metabolismo, fisiología y desarrollo de las plantas huésped.

## **2.3 Microorganismos Rizosféricos**

La comunidad microbiana asociada con las raíces de las plantas se ve influenciada por diversos factores (Çakmakç *et al.*, 2010), debido a la importancia de las interacciones planta – microorganismos y su participación en los procesos de biorremediación (Singh *et al.*, 2004), es de suma importancia el identificar aquellos factores que influyen sobre la diversidad y función de las comunidades microbianas asociadas a la rizósfera (Berg y Smalla, 2009); la mayoría de los estudios de microorganismos asociados a la rizósfera se han enfocado en microorganismos formadores de biopelícula como es el caso de bacterias y microalgas. Sin embargo, ciertas especies de hongos desarrollan relaciones simbióticas con las raíces de las plantas, sin embargo son pocos los estudios que se han centrado en evaluar su participación en los procesos de remoción de contaminantes (Mohamed y Martiny, 2011).

### **2.3.1 Hongos Micorrízicos Arbúsculares**

Se denomina micorriza a la asociación mutualista entre las raíces de las plantas y géneros específicos de hongos que establecen una interacción ecológica denominada simbiosis (Alarcón *et al.*, 2000); en la mayor parte de los casos se le reconoce por tener un papel sumamente importante en la nutrición y supervivencia de las plantas a diferentes tipos de estrés, en particular la micorriza arbúscular ha sido ampliamente estudiada debido a sus aplicaciones en agricultura y horticultura, este tipo de micorriza se caracteriza por la formación de hifas o arbúsculos muy ramificados dentro de las

células corticales de la raíz, que funcionan como sitios primarios para el intercambio de nutrientes (Parniske, 2008), los hongos micorrizicos arbusculares tienen efecto sobre la resistencia a los patógenos de la raíz (Borowicz, 2001), tolerancia a la sequía (Augé, 2001) incluso favorece el establecimiento de la planta bajo condiciones de estrés como son la excesiva salinidad en el suelo o la presencia de elementos potencialmente tóxicos como metales, plaguicidas e hidrocarburos (González-Chávez *et al.*, 2002), la colonización de raíces genera muchos beneficios sobre la nutrición y la protección de las plantas (Dodd *et al.*, 2002).

Los hongos micorrízicos arbusculares actúan como extensiones del sistema radical y aumentan la asimilación de nutrientes del suelo, principalmente fósforo, debido a que el diámetro y longitud de sus hifas les permiten incrementar la extensión de las raíces (Hawkins *et al.*, 2000; Hodge *et al.*, 2001; Govindarajulu *et al.*, 2005); por su parte la planta proporciona compuestos de carbono derivados de la fotosíntesis y otros exudados, que favorecen el desarrollo de los hongos micorrízicos arbusculares (Ferrera - Cerrato, 2007). Los factores edáficos pueden regular la presencia o ausencia de micorrizas, la fertilidad del suelo es un factor clave en la formación de micorrizas, los estudios de campo han demostrado que un aumento en la concentración de fósforo disminuye la colonización de micorrizas (Miller, 2000; Ipsilantis y Sylvia, 2007).

---

### **2.3.2 Hongos solubilizadores de fósforo**

Un grupo diverso de microorganismos están involucrados en el ciclo de fósforo y por lo tanto en los procesos de solubilización de fósforo que abastecen a las plantas con fósforo disponible especialmente en entornos limitados de fósforo, a estos microorganismos se les denomina solubilizadores de fósforo. Los microorganismos asociados a la rizósfera incluyen hongos saprobios, micorriza arbuscular, levaduras, bacterias y actinomicetos (Clark y Zeto, 2000; Al-Falih, 2005; Rudresh *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2007; Hamdali *et al.*, 2008), los cuales se han reportado como solubilizadores de fósforo y juegan un papel importante en la biodisponibilidad de fósforo hacia las plantas. El uso de los microorganismos solubilizadores de fósforo abre un nuevo horizonte para una mejor

productividad agrícola, además limita el uso de agroquímicos peligrosos (Sharma *et al.*, 2013), puesto que en la última década su aplicación como base para biofertilizantes ha cobrado relevancia (Morales *et al.*, 2011).

Los hongos son una parte integral del ciclo del fósforo y como tal desempeñan un papel importante en la biodisponibilidad de este elemento hacia la planta, también son capaces de ejercer un efecto benéfico sobre el crecimiento de la planta; los microorganismos solubilizadores de fosfato, actúan transformando compuestos insolubles de fosfato en formas solubles a través del procesos de solubilización que incluyen acidificación, quelación, intercambio o reacciones enzimáticas como por ejemplo la fosfatasa ácida o alcalina (Gyaneshwar *et al.*, 2002; Naik *et al.*, 2013).

Los hongos tienen ventaja sobre otros microorganismos, por ejemplo son tolerantes a la acidez y por lo tanto puede tener un mejor potencial para convertir moléculas inorgánicas insolubles debido a la acidificación del medio ambiente (Chuang *et al.*, 2007); los hongos saprobios producen mayor proporción de ácidos orgánicos comparados con las bacterias y por lo tanto presentan una mayor actividad de solubilización de fosfato (Scervino *et al.*, 2011). Por otra parte los hongos saprobios no pierden la capacidad para solubilizar fosfato como ocurre con las bacterias (Chuang *et al.*, 2007) y son capaces de colonizar mayor proporción de área, debido a la extensión de las hifas (Khan *et al.*, 2010). Los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* son las más representativas, aunque algunas especies de *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Rhizoctonia*, *Chaetomium*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Gliocladium* y *Humicola* han sido reportado como microorganismos con capacidad para solubilizar fosfatos (Vázquez *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002; Pandey *et al.*, 2008; Posada *et al.*, 2013).

## 2.4 *Phragmites australis*

A diferencia de las plantas terrestres, los macrófitos tienen mayor capacidad de acumulación, de nutrientes, debido a su sistema radical (raíces y rizomas), lo cual les permite una mayor área de contacto con los contaminantes (Bonanno y Giudice, 2010). *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud (Figura 3) conocida como carrizo común es

considerada una especie vegetal invasiva localizada en pantanos y humedales en el este de Estados Unidos y en ambas costas de México, la mayor frecuencia de *P. australis* se ha reportado en las costas del Golfo de México, de acuerdo con Saltonstall (2002) la distribución y abundancia relativa ha aumentado drásticamente en los últimos 150 años.



Figura 3 Morfología de *Phragmites australis*

La distribución y predominancia de *P. australis* en los ambientes acuáticos la ha convertido en una de las especies más interesantes de estudiar, puesto que es una planta que sobrevive bajo condiciones ambientales extremas, incluso en presencia de metales pesados (Rice *et al.*, 2000; Kiviat y Hamilton, 2001), además su uso se ha generalizado en los sistemas de humedales para la mitigación de la contaminación en aguas residuales y en particular a los enfocados a la remoción de nutrientes, como por ejemplo el fósforo. Engloner (2009), recopiló la información de 190 publicaciones relacionadas con la anatomía, morfología y crecimiento de la planta, tanto en la parte aérea como a nivel rizosférico, las características generales reportadas para *P. australis* se resumen en la Tabla 1, se ha determinado que el metabolismo de fijación de carbono corresponde a una planta C3 (Antonielli *et al.*, 2002).

Tabla 1 Características de *Phragmites australis* – (Cav.) Trin. ex Steud

Nombre Común	Carrizo Común
Familia	Poaceae o Gramineae
Sinónimos	<i>P. communis</i> . <i>P. vulgaris</i> . <i>Arundo phragmites</i> .
Habitats	Humedales y ambientes acuáticos
Distribución	Cosmopolita, presente en la mayor parte de las regiones del mundo, pero ausente en cuencas, bosques, selvas y ambientes polares.
Consideraciones	 <p>Tolerante a diferentes condiciones. Temperatura, Humedad, Profundidad de Agua, Salinidad, Acidez.</p> <p>Planta Macrófita acuática, crece tanto en ambientes abiertos como en invernadero.</p>

*Phragmites australis* ha demostrado un alto potencial de restauración de ecosistemas debido a su rápido crecimiento, alta producción de biomasa, capacidad para la asimilación de nutrientes, y sobre todo la capacidad de proporcionar las condiciones favorables para la proliferación de microorganismos de la rizósfera (Bragato *et al.*, 2006; Larue *et al.*, 2010).

### 2.4.1 Remoción de Fósforo

Varios estudios han proporcionado información sobre los niveles de nutrientes en los tejidos de plantas acuáticas y sus tasas de crecimiento en relación con las concentraciones de nutrientes en el medio ambiente, particularmente con respecto a la utilización de especies de macrófitos en el control de la eutrofización. El fósforo en los ambientes acuáticos se encuentra en forma de fosfatos orgánicos e inorgánicos, la forma de ortofosfato libre es el compuesto que puede ser utilizado directamente por plantas y microorganismos, por lo tanto representa un vínculo importante en el reciclaje de fósforo en el ciclo biogeoquímico (Vymazal, 2007). El ciclo del fósforo del suelo es fundamentalmente diferente al ciclo del nitrógeno, pues no existen cambios de valencia durante la asimilación biológica de fósforo inorgánico o durante la descomposición de fósforo orgánico por microorganismos.

Las plantas emergentes y las que cuentan con raíces profundas asimilan los nutrientes a través de los sedimentos, mientras que en el caso de las macrófitas flotantes son asimilados desde el agua, la mayor parte del fósforo es adsorbido a través de las raíces, la adsorción a través de las hojas y los brotes se restringe a especies sumergidas, pero esta cantidad suele ser muy baja (Wetzel, 2001). La captación de fósforo por macrófitos es generalmente más alta durante el comienzo de la temporada de crecimiento (en la mayoría de las regiones durante el comienzo de la primavera), antes de alcanzar la tasa de crecimiento máxima. Adicionalmente se reporta que *P. australis* es capaz de acumular aproximadamente el doble de fósforo ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en las partes aéreas y la rizósfera en comparación con otras macrófitas emergentes, lo cual favorece la remoción de nutrientes en las matrices ambientales (Singh y Srivastava, 2007). *Phragmites australis* pueden assimilar eficientemente los nutrientes debido a su alta productividad de biomasa además forma una extensa matriz de raíces que proporciona una superficie extensa para la adsorción de los nutrientes (P y N) y los iones metálicos (Rezaie y Salehzadeh, 2014).

#### 2.4.2 Asimilación de metales

*Phragmites australis* ha sido utilizado en los humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales urbanas e industriales que contienen metales. Las macrófitas acuáticas están ampliamente distribuidos en diversos ambientes, desde al agua dulce hasta ecosistemas de agua salada y cuentan con varias características favorables para la acumulación de metales; los factores que influyen sobre la acumulación de metales por las plantas acuáticas pueden ser bióticos (especie, edad fisiológica, nutrición y metabolismos) y abióticos (temperatura, salinidad, pH, concentración de metales, tiempo de exposición, temporada). En particular, la acumulación de metales por macrófitas es afectada por las concentraciones de metales en agua y sedimentos. Debido a sus raíces fibrosas con grandes áreas de contacto, las plantas acuáticas en general, tienen la capacidad de acumular grandes concentraciones de metales en los tejidos de la planta, que aquellas plantas presentes en el entorno circundante (Bragato *et al.*, 2006; Lesage *et al.*, 2007; Vymazal *et al.*, 2007).

En términos generales, la acumulación de un metal esta en función de la capacidad de adsorción y de los sitios de unión intracelulares (Clemens *et al.*, 2002). Se ha reportado que *Phragmites australis* cuenta con una gran cantidad de lignina y celulosa, estos compuestos han sido reconocidos por su capacidad de sorción de iones metálicos a partir de soluciones acuosas, en el trabajo de Southichak *et al.*, (2006) se reportó la capacidad de asimilación de metales a partir de biomasa de *P. australis*, y se demostró se utilidad como biosorbente para metales como Ni, Zn, Cd, Pb y Cu. Por otra parte Bonanno y Giudice (2011), reportaron correlaciones positivas entre las concentraciones de metales pesados en la planta, muestras de agua y sedimentos, los autores indicaron que los tejidos de *P. australis* reflejan los efectos acumulativos de los metales presentes en agua y sedimentos.

### 2.4.3 Microorganismos Rizósfericos

La mayor parte de las plantas acuáticas incluida *P. australis* pueden llevar oxígeno de la parte aérea hacia la raíz, esto es debido a la presencia de una estructura porosa en las raíces denominada aerénquima (Soukup *et al.*, 2002), este suministro de oxígeno favorece la existencia de un microambiente oxigenado que permite el establecimiento de colonización microbiana en la raíz que permanece sumergida en el agua (Oliveira *et al.*, 2001). Los microorganismos en los humedales están presentes en las biopelículas formadas sobre la superficie (Gagnon *et al.*, 2007), en los sedimentos (Wang, 2013) e incluso en asociados a la rizósfera de las plantas (Ma *et al.*, 2014), las raíces de *P. australis* proporcionan las condiciones óptimas requeridas para la colonización microbiana, por lo que cuenta con una variedad de microorganismos asociados a su rizósfera que participan en los procesos ecológicos (Chaturvedi *et al.*, 2006), en el caso particular de *P. australis* se ha reportado la presencia de micorriza en su mayoría especies de las familias *Glomeraceae* y *Rhizoglonus* que favorecen el desarrollo de la planta en sitios perturbados (Oliveira *et al.*, 2001) y una serie de microorganismos simbióticos, que pudieran estar involucrados en diferentes procesos relacionados con la planta huésped (Ma *et al.*, 2014).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las raíces de las plantas en un humedal son el primer contacto de la planta con el ambiente y a su vez son el soporte para el desarrollo de microorganismos simbióticos que participan en diferentes procesos metabólicos en pro del beneficio de la planta; las interacciones entre las plantas y los microorganismos son una parte integral de los ecosistemas, por lo que el estudio de dichas interacciones es de suma importancia para comprender su influencia en los procesos de remoción de contaminantes, fenómenos como la eutrofización y la contaminación por metales pesados en ambientes acuáticos han sido ampliamente estudiados sin embargo por lo general han sido estudiados por separado e inclusive la participación de los microorganismos rizósfericos no ha sido elucidada por completo, en particular *Phragmites australis* debido a sus características y al amplio uso que ha tenido en biorremediación, es un modelo de estudio que nos permitirá inferir el papel de los hongos simbióticos asociados a su rizósfera en los procesos de solubilización de fosfato en presencia de metales pesados, pues el conocimiento sobre esta interacción aún es limitado.

## 4. HIPÓTESIS

### General

Los hongos simbióticos asociados a la rizósfera participan en la solubilización de fosfato y pudieran estar involucrados con la eficiencia de remoción de metales .

### Particulares

1. Los hongos asociados a la rizósfera de *Phragmites australis* cuentan con habilidad para solubilizar fosfato en presencia de metales.
2. La presencia de hongos simbióticos asociados a la rizósfera confiere tolerancia y favorece la acumulación de metal en los tejidos de *Phragmites australis*.

## 5. OBJETIVOS

### General

Determinar el papel de los hongos asociados a la rizósfera de *Phragmites australis* en la solubilización de fosfato en presencia de metales.

### Particulares

1. Evaluar el efecto tóxico ejercido de los metales sobre el crecimiento y la capacidad de solubilización de fosfato de los hongos asociados a la rizósfera de *Phragmites australis*.
2. Evaluar el efecto de los factores nutricionales (fuentes de glucosa y nitrógeno) sobre la capacidad de solubilización de fosfato inorgánico de hongos asociados a la rizósfera de *Phragmites australis* en presencia de metal.
3. Evaluar la capacidad de *Phragmites australis* para asimilar fósforo inorgánico en presencia de metales particularmente  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  en relación con la habilidad de acumulación de metal en los tejidos de la planta.
4. Determinar el efecto de la interacción entre micorriza y hongos solubilizadores de fosfato en la asimilación de fosfato y la acumulación de metal en los tejidos de *Phragmites australis*.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

**ETAPA 1**  
**Caracterización**  
**Rizósferica**

**ETAPA 2**  
**Experimentos**  
***In Vitro***

**ETAPA 3**  
**Experimentos**  
**Hidropónicos**

**Muestreo (Plantas, suelo  
rizósferico, agua y  
sedimentos).**

**Caracterización de suelo  
y agua**

**Hongos micorrizicos  
arbusculares (HMA).**

**Hongos solubilizadores  
de fosfato (HSF).**

**Índice de solubilización  
de fosfato inorgánico**

**$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y  $\text{FePO}_4$ .**

**Ensayos Dosis -  
Respuesta**

**Evaluación de peróxido  
de hidrógeno**

**Evaluación de ácidos  
orgánicos (HPLC)**

**Evaluación de actividad  
enzimática**

**Ensayo de tolerancia  
*Phragmites australis***

**Asimilación de fosfato**

**$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$**

**$\text{FePO}_4$**

**Dosificación de metales**

**( $\text{Cd}^{+2}$  and  $\text{Pb}^{+2}$ )**

**Co-inoculación en  
*Phragmites australis***

## 6.1 Muestreo

### 6.1.1 Sitio de muestreo

La zona de trabajo que incluye la Laguna La Mancha – El Llano, forma parte de una microcuenca del municipio de Actopan, esta región se ve cruzada de norte a sur por la carretera costera federal numero 180 en el tramo Cardel-Nautla. La figura 4 muestra la ubicación de esta región, como punto de referencia, la ciudad más cercana es José Cardel. La zona costera del municipio de Actopan está delimitada por el río Limón al norte y por el río Agua Fría al sur, se ubica entre las coordenadas  $96^{\circ} 32'22.80''$  W,  $19^{\circ}44'7.47''$ N y  $96^{\circ}18'40.79''$  W,  $19^{\circ}25'46.01''$ N. La región comprende cinco pequeñas cuencas, tres de ellas vierten sus escurrimientos hacia las lagunas de La Mancha, El Farallón y El Llano respectivamente.

La Laguna La Mancha ( $19^{\circ} 35' 16.42''$ N y  $96^{\circ} 23' 10.88''$ W), fue el sitio en donde se realizó la colecta de plantas, suelo rizósferico, agua y sedimentos con un espejo de agua de 135 ha mide aproximadamente 3 km de longitud y tiene una barra que la separa del mar, la cual se abre durante la época de lluvias. Esta laguna se encuentra rodeada por manglar (300 ha). El río Caño Grande, afluente del Gallegos, se ubica al suroeste del sistema. Al arroyo El Caño se ubica al norte y aporta una cantidad de agua mucho menor que el primero, estos son los únicos aportes permanentes de agua dulce a la laguna de La Mancha.

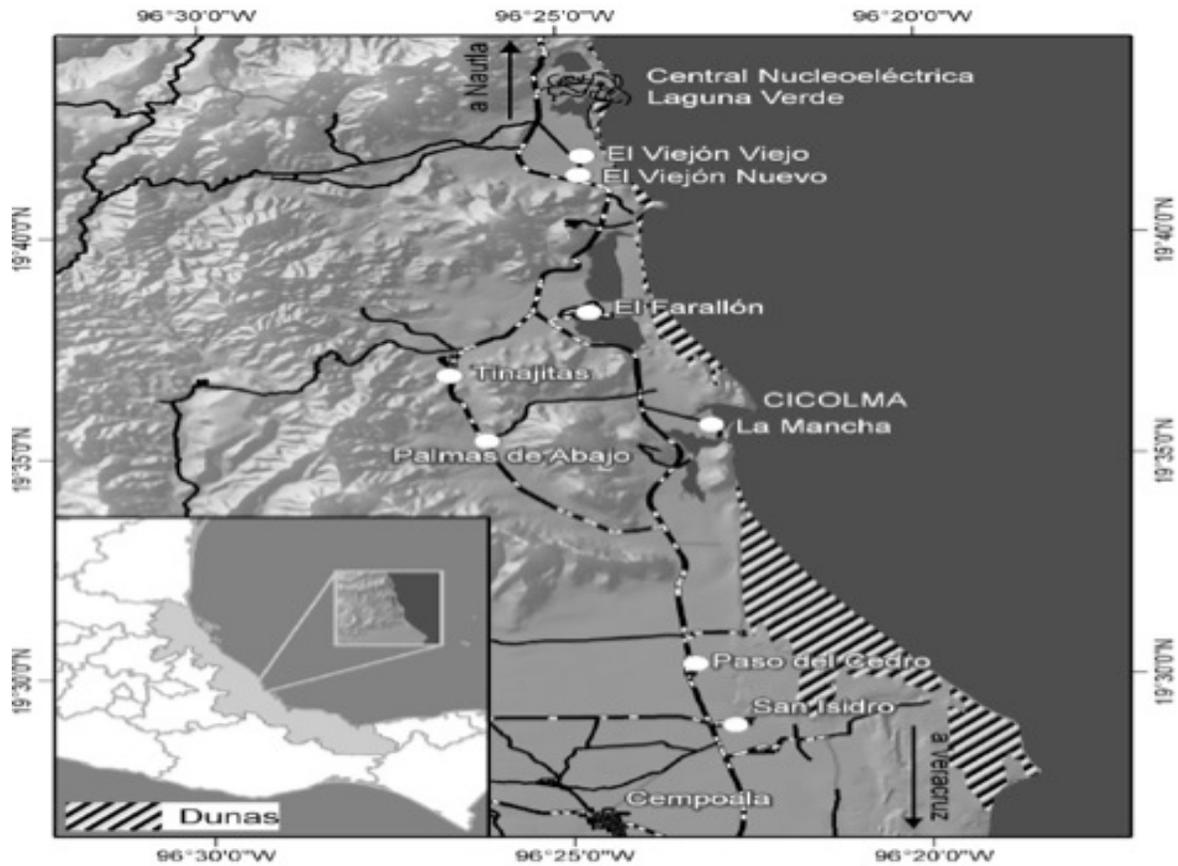


Figura 4. Mapa de la región donde se localizan las lagunas La Mancha, El Farallón, El Llano y el Centro de Investigaciones costeras La Mancha (CICOLMA), en el municipio de Actopan, Veracruz. Tomado de Madera bosques vol.15 no.3 Xalapa Jan. 2009

### 6.1.2 Recolección de muestras

Tres áreas de muestreo fueron elegidas considerando los gradientes hidrológicos, la temporada de lluvias coincide con el máximo y mínimo de los períodos vegetativos de *Phragmites australis* (Asaeda et al., 2006). Los muestreos se realizaron durante dos periodos al año en los meses de Mayo y Noviembre, los sitios de muestreo fueron marcados como BR1, BR2 y BR3; y AR1, AR2 y AR3 cuyas siglas significan Before Rain (antes de la temporada de lluvia) y After Rain (después de la temporada de lluvia). Esta clasificación se estableció teniendo en cuenta el estudio realizado por Ma *et al.*, (2014) de acuerdo con los siguientes criterios (Figura 5):

- Área BR1 (AR1) está completamente anegado, las carrizos están sumergidos con frecuencia y el suelo esta inundado.
- Área BR2 (AR2) temporalmente inundado, está situada en la orilla del humedal, donde las inundaciones rara vez ocurren pero donde el suelo está saturado de agua durante el período húmedo.
- Área BR3 (AR3) borde exterior, se encuentra en la zona más externa del humedal, donde los carrizos tienen un suministro suficiente de agua durante el período seco.



Figura 5. Criterios de muestreo aplicados en este proyecto

### 6.1.3 Propagación de Plantas

Las plantas de *Phragmites australis* fueron identificadas de acuerdo al criterio botánico establecido por Swearingen y Saltonstall (2010), después de la recolección, las plantas se lavaron con agua corriente, y posteriormente se mantuvieron en agua dulce durante los primeros tres días. Para la propagación de plantas se utilizó una solución de nutrientes Long - Ashton (Tabla 2), posteriormente al crecimiento de las raíces adventicias se procedió a la cosecha y poda de brotes que serán utilizados para los ensayos en invernadero.

Tabla 2 Solución nutritiva Long Ashton

Compuesto	Solución stock (g L <sup>-1</sup> )	Cantidad para preparar un litro (mL)
<b>Macronutrientes</b>		
<b>KNO<sub>3</sub></b>	80	5
<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	73.6	5
<b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O</b>	188.8	5
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O</b>		
<b>Fósforo bajo</b>	36.8	1.34 <sup>a</sup>
<b>Fósforo alto</b>	92	2 <sup>b</sup>
<b>Micronutrientes</b>		
		1
<b>MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O</b>	1.69	
<b>CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O</b>	0.25	
<b>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	0.29	
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	3.1	
<b>NaCl</b>	5.9	
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O</b>	0.088	
<b>Solución de citrato férrico</b>		5
<b>FeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub></b>	4.9	
<b>H<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O</b>	4.9	

- a. Cantidad aplicada para 11 µg mL<sup>-1</sup> P  
b. Cantidad aplicada para 30 µg mL<sup>-1</sup> P

---

### 6.1.4 Análisis Físicoquímico

Los análisis realizados a las muestras de agua y sedimentos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 Análisis físicoquímico aplicado a muestras de agua y sedimentos

Methodologías para sedimentos	Methodologías para agua
Materia orgánica / Humedad / Textura	DQO / DBO
pH / Conductividad eléctrica	Oxígeno disuelto / Potencial redox / pH
Nitrógeno: Kjendahl, AOAC 42.014,1970	
Fósforo (Método metavanadato – molibdato / Ácido fosfórico APHA 4500 – P – C)	
Metales pesados método EPA 3050B.	

---

### 6.1.5 Caracterización Microbiológica

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo para llevar a cabo la caracterización microbiológica:

- Agar nutritivo: Utilizado para el recuento de bacterias en la caracterización de suelos y aguas.
- Papa Dextrosa Agar (PDA): El medio de cultivo utilizado para la conservación de las cepas, se utilizó este medio para propagar todas las cepas utilizadas en este trabajo.
- Extracto de Malta de Agar (EMA): medio utilizado como una alternativa para el cultivo de cepas de hongos.

## 6.2 Caracterización Micorrízica

Uno de los puntos críticos de la evaluación de la colonización micorrízica es el muestreo de suelo rizósferico, raíces y sedimentos, el muestreo se enfocó en los siguientes aspectos:

- Efecto de los agentes de perturbación (erosión, inundaciones, entre otros)
- La tolerancia a factores ambientales: salinidad, acidez, alcalinidad, nutrientes, presencia de contaminantes, entre otros.
- Etapa fenológica del huésped

Las muestras de suelo rizósferico y sedimentos se utilizaron para establecer un inóculo base para cultivos trampa y la evaluación de colonización micorrízicas en las raíces de *Phragmites australis*.

---

### 6.2.1 Cultivos Trampa

Los cultivos trampa son utilizados para los estudios de diversidad de hongos micorrizicos debido a que revelan la presencia de especies activas o latentes en el campo; también son útiles para la obtención de nuevos inóculos que se puede utilizar para establecer cultivos puros. El método propuesto se basa en los protocolos de Stutz y Morton (1996).

Para el establecimiento de cultivos trampa se deben de utilizar plantas con un sistema radical denso por lo tanto, se prefiere trabajar con plantas como el sorgo, maíz, trigo, cebada y otras dicotiledóneas como alfalfa, trébol o girasol, que han sido utilizados con éxito; el suelo rizósferico también puede utilizarse como propágulos para empezar la propagación de micorrizas, estas plantas también permiten una mayor establecimiento de simbiosis en su sistema de raíces, lo que también favorece a la esporulación y es posible el establecimiento cultivo trampa a través de la siguiente protocolo:

Se sembraron macetas de 1 Kg, fueron sembradas 25 semillas por maceta, las cuales fueron cubiertas con mezcla de suelo – arena, el sustrato se regó a la capacidad de campo

con agua destilada estéril o con la solución nutritiva Long – Ashton con bajo contenido de fósforo (Tabla 3). El sustrato utilizado fue arena con tamaño de partícula de 200 a 400, (esterilizada tres veces a 121 ° C, tres ciclos, cada ciclo de 1 hora), *Sorghum sp.*, *Lactuca sativa* y *Allium cepa* como plantas trampa. Las plantas trampa para la propagación se mantuvieron durante períodos de seis meses en el invernadero (temperatura media: mínima 10 ° C y 40 ° C como máximo y fotoperíodo de horas luz / oscuridad 14/10), los cultivos fueron revisados periódicamente para evaluar la infectividad y efectividad del inóculo

### 6.2.2 Extracción de Esporas y Cuantificación

Para la determinación de las esporas y raíces colonizadas, se aplica el método de tamizado y decantación propuesto por Gerdemann y Nicolson (1963), que se utiliza tanto para la extracción de esporas como para el aislamiento y para la cuantificación de esporas en muestras de suelo o sedimentos (Figura 6).

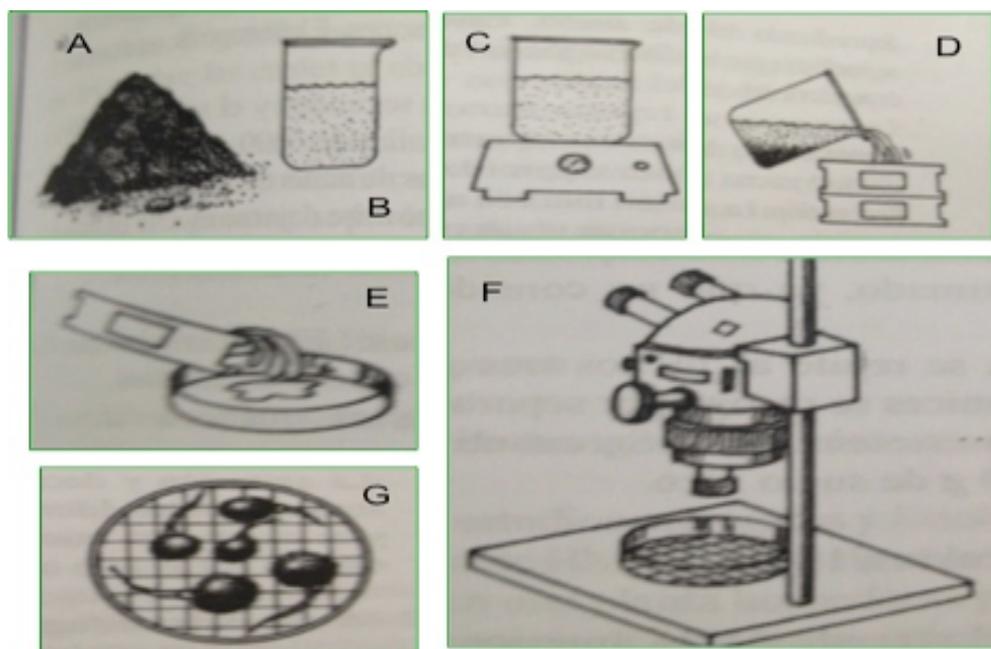


Figura 6. A) Muestra de suelo rizósferico (100 g) colocada en un recipiente con agua; B) Agitar la suspensión; C) Dejar reposar para posteriormente decantar el sobrenadante y capturar las esporas en tamices con tamaño de partícula de 100 hasta 45 mm, D) Recolectar las esporas para su observación, E) and F) Observación al Microscopio.

---

### 6.2.3 Procedimientos de Tinción de Raíces

#### *Clareo y Tinción de Raíces con Azul Tripaño*

El análisis morfológico de las raíces teñidas es utilizado para cuantificar los niveles de colonización en las raíces, los hongos micorrizicos no causan cambios morfológicos visibles en las raíces colonizadas, sin embargo a nivel microscópico se observa la presencia de hifas intracelulares y arbusculos, en algunas especies también se aprecian vesículas intracelulares, así como esporas; para la observación de estas estructuras es necesario eliminar el contenido de compuestos fenólicos en las células corticales, para posteriormente teñir el tejido fúngico.

1. Las raíces se lavaron y se cortaron en segmentos de 1 cm.
2. Los segmentos se colocaron en una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10% P/V de 12 a 36 horas dependiendo de la coloración de las raíces.
3. El KOH fue retirado y las raíces se lavaron con agua.
4. Se realizó un blanqueo adicional con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$  al 33%) 3% P/V durante 10 a 30 min
5. Se retiró el  $H_2O_2$  y las raíces blanqueadas se lavaron con agua
6. Las raíces se acidificaron por inmersión en solución de ácido clorhídrico (HCl) al 10% V/V durante 10 minutos.
7. Por último se retiró la solución de ácido sin enjuagar y las raíces se teñieron con una solución de azul tripaño (0,05% P/V disuelto en glicerol al 50% ), estas raíces se mantuvieron en oscuridad hasta por 48 horas, después se eliminó el exceso de colorante utilizando glicerol al 50 % V/V.
8. 15 Fragmentos de raíces teñidas de aproximadamente 1 cm. se colocaron sobre los portaobjetos, estas preparaciones se realizaron por triplicado y a partir de su observación al microscopio se determinó el porcentaje de colonización.

#### *Tinción Vital*

Los métodos tradicionales de tinción de raíces colonizadas no consideran el estado metabólico del tejido fúngico que se desarrolla en el tejido vegetal, debido a que los

tinción no distinguen tejido fúngico vivo del muerto, por lo que se han desarrollado técnicas basadas en la tinción histoquímica de varias enzimas como la succinato deshidrogenasa que funciona a nivel mitocondrial y la fosfatasa alcalina localizada dentro de las vacuolas de las hifas acumulando fósforo.

1. Las raíces se lavaron con agua corriente y se cortan en segmentos alrededor de 1 cm.
2. Posteriormente se colocaron durante una hora en solución tampón TRIS pH 7.4 con 0,05% de sorbitol, celulasa (15 unidades) y pectinasa (15 unidades). Este tratamiento promueve la descomposición de la pared celular, pero se puede omitir
3. A continuación, las raíces se enjuagaron y se colocaron en la oscuridad de 12 a 18 horas en la solución de tinción de fosfatasa que consiste en:
  - 0.5 M regulador TRIS / ácido cítrico pH = 7.4
  - Azul rápido (Fast Blue) 1 mg mL<sup>-1</sup>
  - Ácido  $\alpha$  - naftil fosfato 1 mg mL<sup>-1</sup>
  - Cloruro de magnesio 1.0 mg mL<sup>-1</sup>
  - Cloruro de manganeso 0.8 mg mL<sup>-1</sup>
4. Las raíces se retiraron de la solución de tinción y se sumergieron durante 7 minutos en hipoclorito de sodio al 1% V/V
5. Las raíces se contra tiñieron durante toda la noche en la oscuridad a temperatura ambiente en una solución de fucsina ácida (0,1% P/ V en 50% de glicerol V/V)
6. Los fragmentos de raíz (15 - 20) se colocaron al azar en un portaobjetos, estas preparaciones se realizaron por triplicado, para determinar el porcentaje de colonización de micorriza activa, la cual se identificaron por la coloración negra mostrada.

---

#### **6.2.4 Evaluación de Colonización de Raíces**

Los segmentos radicales teñidos de aproximadamente 1 cm fueron seleccionados, de 15 a 20 de estos segmentos se colocaron en un portaobjetos añadiendo glicerol al 50 % (V/V), se prepararon de tres a cinco réplicas por muestra.

### *Estimación de la frecuencia de colonización*

La frecuencia de colonización se determina considerando los segmentos colonizados y no colonizados. El porcentaje se obtiene por la relación de segmentos colonizados con respecto al total de segmentos analizados, a través de la fórmula:

$$\text{Colonización Total (\%)} = (\text{Número de segmentos colonizado} / \text{No. segmentos totales}) \times 100$$

### *Porcentaje estimado de raíz colonizada*

Se obtiene la tasa de colonización utilizando un sistema simple teniendo en cuenta el área total del córtex y el colonizado por micorriza arbuscular. Por ejemplo 1 = 0%, 2 = 25%, 3 = 50%, 4 = 75% y 5 = 100%, este porcentaje se puede evaluar con base a colonización total, arbuscúlos, vesículas e hifas.

## **6.3 Hongos Solubilizadores de Fosfato**

### **6.3.1 Aislamiento de Hongos Solubilizadores de Fosfato**

Se tomaron cinco muestras al azar, y compuestas de 4-6 muestras del suelo rizósferico, por otra parte se tomaron muestras de agua que fueron recolectados en frascos de polietileno de 1 litro. Las muestras de sedimentos fueron recolectados a 25 – 30 cm de profundidad, con una pala de acero inoxidable. El programa de muestreo se llevó a cabo en tres ocasiones; mayo, agosto y noviembre de 2013 y 2014.

### **6.3.2 Medio Pikowskaya**

La habilidad de solubilización de fosfato de los microorganismos aislados de la rizósfera de *Phragmites australis* fue evaluada en un medio de cultivo Pikovskaya modificado, que consistió (en gL<sup>-1</sup>): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5), KCl (0,2), MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O (0,1), MnSO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O (0.004), NaCl (0,2), D-glucosa (10), FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O (0,002) (Sigma-Aldrich), extracto de levadura (0.5), goma arábica (0.5) y agua destilada (1000 ml). Para la fuente de fósforo inorgánico

(0.5) se utilizó fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) o fosfato férrico ( $\text{FePO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), ambos adquiridos en Sigma-Aldrich.

---

### 6.3.3 Aislamiento de Hongos Rizósfericos

Los hongos con capacidad de solubilizar fosfato se aislaron diluyendo en serie las muestras de suelo hasta  $10^{-3}$  en agar rosa de bengala que contiene estreptomicina y fosfato tricálcico [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] como una fuente de fósforo inorgánico insoluble. Para cada una de las muestras de suelo, las raíces se recuperaron y se lavaron con agua corriente, para posteriormente desinfectarlas superficialmente durante 3 minutos con hipoclorito de sodio ( $\text{NaOCl}$ ) al 3% (V/V), las raíces se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se cortaron en fragmentos de 5 mm aproximadamente. Para el aislamiento de hongos solubilizadores asociados a la rizósfera, cada fragmento de la raíz se transfirió a placas de Petri conteniendo medio Pikowskaya, en este medio de cultivo, pasados 3 días de incubación a  $25^\circ \text{C}$ , la presencia de un halo cristalino alrededor de la colonia fue indicativo de su capacidad para la solubilización de fosfato. Las colonias con zonas claras se purificaron adicionalmente, mediante la replantación en agar papa dextrosa (PDA) para el mantenimiento y la conservación de las cepas aisladas.

---

### 6.3.4 Identificación Molecular de los hongos (Género y Especie)

Para la identificación a nivel de género y especie de los hongos aislados de la rizósfera de *P. australis*, los micelios de las cepas estudiadas se desarrollaron en medio extracto de levadura (CYM estándar: dextrosa, 20 g; peptona, 2 g; extracto de levadura, 2 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,46 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 g y agua destilada; 1000 mL), posteriormente a la inoculación, se incubaron a  $25^\circ \text{C}$ . El micelio se filtró y se colocó en tubos de Eppendorf (1.5 ml), para posteriormente ser tratado con nitrógeno líquido ( $-130^\circ \text{C}$ ). La Extracción de ADN genómico y la purificación de las muestras se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo publicado por Challen *et al.*, (1995). La pureza de las muestras de ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5%, P/V) y posterior tinción con bromuro de etidio. La amplificación por PCR se llevó a cabo usando los siguientes primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-

3'). Los productos purificados obtenidos a partir de la PCR fueron secuenciados por el Centro de Biotecnología Genómica - IPN (Reynosa, Tamaulipas, México). Cada secuencia de ADN fue analizada utilizando el programa BLAST, y los resultados fueron comparados con la base de datos del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), también se utilizó el Index Fungorum ([www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org)) para determinar las características de cada especie.

## 6.4 Ensayo Dosis Respuesta

Los siguientes compuestos comerciales fueron utilizados para suplementar el medio de cultivo Pikovskaya-agar con  $\text{Al}^{3+}$  ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ ),  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\text{CdSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ),  $\text{Co}^{2+}$  ( $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ),  $\text{Ni}^{2+}$  ( $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ),  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ),  $\text{Zn}^{2+}$  ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ),  $\text{Pb}^{2+}$  ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) para el caso de cromo trivalente y en forma hexavalente se utilizaron las sales de sulfato  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{Cr}^{3+}$ ) y  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  ( $\text{Cr}_{6+}$ ), respectivamente (JT Baker® Químicos, Center Valley, PA, EU). Se fijaron cuatro concentraciones de metales pesados para cada compuesto (0.15, 0.31, 0.62 y 1.2 mM) y un medio de cultivo sin el metal se utilizó como el control. Para metales como el Cd y el Cr debido a su toxicidad las concentraciones más baja y más alta se establecieron en 0.075 y 0.62 mM.

Cada hongo se inoculó en el centro de las placas de Petri utilizando 5  $\mu\text{L}$  de una solución de esporas ( $1 \times 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ). Las placas se incubaron en la oscuridad a 25 ° C y humedad relativa del 75%. Se utilizaron cuatro repeticiones de cada concentración y también para el control. Los diámetros de colonias y halos de solubilización se midieron todos los días utilizando un cuadrado milimétrica. El bioensayo de dosis-respuesta terminó cuando el halo de los controles sin adición de metal control alcanzaron el borde de las placas de Petri.

### 6.4.1 Parámetros de Crecimiento

A través de los diámetros evaluados diariamente se calcularon las siguientes variables de crecimiento específicas: Tasa de crecimiento de diámetro (DGR por sus siglas en inglés Diameter Growth Rate), definido como  $\text{DGR} = \Sigma (D1 - D0) / (T1 - T0)$ , donde D0 y D1 son

los diámetros de halo a los tiempos T0 y T1, respectivamente; y tasa de crecimiento de halo (HGR por sus siglas en inglés Halo Growth Rate), definido como  $HGR = \Sigma (H1 - H0) / (T1 - T0)$ , donde H0 y H1 son los diámetros colonia en tiempos T0 y T1, respectivamente. Los resultados DGR y HGR se utilizaron para calcular el índice de solubilización de fosfato (PSI por sus siglas en inglés Phosphate Solubilization Index) utilizando la ecuación  $PSI = HGR / DGR$ .

#### **6.4.2 Parámetros Toxicológicos**

El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (MGI por sus siglas en inglés Mycelial Growth Rate) se calculó utilizando  $MGI = [(C - T) / C] \times 100$ , donde T y C son los diámetros del micelio dentro del control y las placas de tratamiento, respectivamente. La concentración efectiva media (MEC<sub>50</sub> por sus siglas en inglés Minimal effective concentration) se definió como la cantidad de metal pesado que inhibía la tasa de crecimiento del micelio en un 50% y se calculó por análisis Probit utilizando el programa estadístico SAS 9.1. El índice de tolerancia a metales (TI, por sus siglas en inglés Tolerance Index) se calculó utilizando la fórmula descrita por Ezzouhri et al.(2010), que es  $TI = \Sigma (Dt / Du) / (T1 - T0)$ , donde Dt es el diámetro (cm) de la colonia tratada y Du es el diámetro (cm) de la colonia no tratada (cm) a los tiempos T0 y T1, respectivamente.

#### **6.5 Experimentos en Medio Líquido**

El medio de cultivo Pikowskaya modificado (120 mL) fue depositado en matraces Erlenmeyer de 250 mL previamente esterilizado en autoclave (15 minutos a 22 psi y 120 ° C). Los hongos se inocularon en los matraces usando 200 µL de una solución de esporas ( $1 \times 10^6$  esporas mL<sup>-1</sup>) de cada hongo. La solución de esporas se preparó a partir de cultivos en caja Petri con siete días de crecimiento, para lo cual utilizando un sacabocados se retiró un disco de agar con crecimiento micelial de 7 días el cual fue depositado en agua destilada estéril suplementado con Tween 20® a 0.05%. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Las esporas de la solución se contaron y se ajustaron utilizando una cámara de Neubauer (Hausser Sci., Horsham, PA, E.U.)

## 6.6 Métodos Analíticos

### 6.6.1 Determinación de la Solubilización de Fosfato

Determinado por el método de azul de fosfomolibdeno, esta determinación se basa en la siguiente reacción: heptamolibdato de amonio y de tartrato de potasio antimonio (III) reaccionan en medio ácido con una solución diluida de fosfato para formar un complejo de antimonio-fosfomolibdato. Este complejo se reduce con ácido ascórbico generando un complejo de color azul intenso (AOAC, 1980). El complejo se midió a 880 nm en un espectrofotómetro Shimadzu 8000 UV/VIS (Shimadzu Corp., Japón). La curva estándar fue:  $y = 0.2173c + 0.0433$  ( $y = OD_{880}$ ,  $c =$  solubilización de fosfato en  $mgL^{-1}$ ,  $R^2 = 0.983$ ).

### 6.6.2 Peróxido de Hidrógeno

Determinado mediante el método de yoduro/yodato. Las soluciones A y B para el método de  $I_3^-$  se prepararon de acuerdo a la receta habitual de Klassen et al. (1994). La solución A consiste en 33 g de KI, 1 g de NaOH, y 0.1 g de  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  (molibdato de amonio tetrahidratado) diluido hasta 500 mL con agua. La solución A se mantiene en la oscuridad para inhibir la oxidación del yodo. La solución B es un buffer acuoso que contiene 10 g de  $C_8H_4KO_4$  (ftalato ácido de potasio) disuelto a 500 mL con agua. El método consiste  $I_3^-$  en la mezcla de proporciones iguales de A (3 mL) y B (3 mL), seguido por la adición de sobrenadante de medio de cultivo (3 mL). La absorbancia de la solución resultante se midió a 351 nm en una celda de cuarzo de 3 cm. La absorbancia del blanco se determinó mediante la sustitución de la muestra de medio de cultivo por agua desionizada estéril en la mezcla de reacción. Las concentraciones de peróxido de hidrógeno se calcularon mediante la sustitución de la absorbancia en una curva estándar con pura reactivo de peróxido de hidrógeno (30%, JT Baker™, Center Valley, PA, EE.UU.) a concentraciones conocidas (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5 mg / L). La curva estándar fue:  $y = 0.134c + 0.0164$  ( $y = OD_{351}$ ,  $c =$  peróxido de hidrógeno en  $mgL^{-1}$ ,  $R^2 = 0.997$ ).

---

### 6.6.3 Determinación de Ácidos Orgánicos

Para la determinación de ácidos orgánicos se filtraron 10 mL de medio de cultivo en papel de filtro de poro medio, a continuación, se procedió a preparar la muestra de acuerdo con el siguiente procedimiento.

#### *HPLC Preparación de la muestra*

1. Limpieza con cartuchos C-18 (Supelco DSC-18)
2. Ajuste del pH a 2.2 con ácido clorhídrico 1N
3. Tratamiento con carbón activado por cada mililitro de extracto, se agita a 120 rpm durante 1 hora.
4. Para eliminar los residuos de carbón activado del sobrenadante se filtro a través de un disco con membrana de nylon de 0.2  $\mu\text{m}$

#### *Cuantificación*

Se llevó a cabo empleando un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detector de UV, utilizando como fase móvil ácido sulfúrico 4 mM, con un flujo de 0.4 ml min<sup>-1</sup> y como fase estacionaria una columna Aminex de exclusión iónica HPX-87H de 300 mm de longitud, diámetro de 7.8 mm, en el detector se estableció 210 nm como la longitud de onda para la detección del ácido oxálico.

---

### 6.6.4 Proteína y Cuantificación de Biomasa

El contenido de proteína de los extractos se estimó de acuerdo con el método de Bradford. Se utilizó Albúmina de suero bovina como un estándar a concentraciones conocidas (0.0062, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg mL<sup>-1</sup>).

Para el análisis de peso seco, la suspensión del medio de cultivo se filtró a través de papel de filtro Whatman No. 1 previamente pesado y mantenido a peso constante, la biomasa fúngica se lavó con agua destilada esterilizada. Para la cuantificación de peso seco, los filtros conteniendo el micelio filtrado se secaron en un horno a 60 °C y posteriormente fueron pesados en la balanza restando el peso del papel.

---

### 6.6.5 Actividad Fosfatasa

La determinación de la actividad fosfatasa se realizó de acuerdo con métodos publicados Tabatabai y Bremner (1969) y Tabatabai (1982). Una solución de buffer universal modificado (BUM) fue preparado disolviendo 12.1 g de Tris- aminometano clorhidrato, 11.6 g de ácido maleíco, 14.0 g de ácido cítrico y 6.3 g de ácido bórico en 488 ml de NaOH 0.1 M y el volumen se ajusta a 1000 mL.

#### *Actividad Fosfatasa alcalina (ALP)*

La solución madre BUM (200 mL) se ajustó a pH 11 mediante la adición de NaOH 0.1 M y se diluyó a 1000 mL con agua Milli-Q (Solución BUM pH 11). Posteriormente se disolvieron 0.928 g de p-nitrofenil fosfato en 100 mL de solución BUM pH 11 esta solución en lo sucesivo se denominó sustrato alcalino.

#### *Actividad de Fosfatasa ácida (ACP)*

La solución madre BUM (200 mL) se ajustó a pH 6.5 mediante la adición de HCl 0.1 M y se diluyó a 1000 mL con agua Milli-Q (Solución BUM pH 6.5). Posteriormente se disolvieron 0.928 g de p-nitrofenil fosfato en 100 mL de solución BUM pH 6.5 esta solución en lo sucesivo se denominó sustrato ácido.

#### *Reacción*

La mezcla de reacción (750  $\mu$ L) que contiene 150  $\mu$ l de medio de cultivo, 120  $\mu$ l de sustrato ya sea ácido o alcalino dependiendo la reacción y 480  $\mu$ l de BUM, la mezcla de reacción se incubó a 37 ° C durante 60 min. La reacción se terminó mediante la adición de 100  $\mu$ l de buffer de glicina-NaOH (0.4 M, pH 10.8). El color amarillo desarrollado se midió a 405 nm usando un espectrofotómetro UV-VIS. Una unidad (U) de actividad de la fosfatasa es la cantidad de enzima requerida para liberar 1 g de pNP por hora por ml de filtrado de cultivo bajo las condiciones de ensayo. La actividad fosfatasa se calculó como:

$$Z = \Delta C \times V / 1000 / \Delta t [\mu\text{mol}/\text{min}]$$

donde Z es Actividad Fosfatasa,  $\Delta C$  es el incremento en la concentración de PNP ( $\mu\text{mol}$ ), V es el volumen total de la solución de sustrato (mL),  $\Delta t$  es el tiempo de incubación (min).

### 6.6.6 Diseño Experimental

Para estudiar el efecto de la adición de metales pesados y los factores nutrimentales sobre la capacidad de solubilización de fosfato de los hongos saprobios, se aplicó un diseño factorial  $2^4$ . Los factores estudiados fueron: concentración de metal, las cantidades de glucosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y el extracto de levadura. El análisis de los datos se llevó a cabo a través del Disign Expert 8.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, E.U.). La ecuación 1 se utiliza para describir el modelo de regresión, que incluye términos de interacción:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Donde  $\beta_0$  es el término constante,  $\beta_i$  y  $\beta_{ij}$  son el coeficiente de regresión,  $\varepsilon$  es el error,  $x_i$  son las variables y n su número.

## 6.7 Experimentos Hidropónicos

### 6.7.1 Ensayo de Toxicidad

La composición de las aguas residuales es diversa, en este trabajo nos centramos principalmente en la presencia de fosfatos inorgánicos responsables de la eutrofización en los ambientes acuáticos además se considero la presencia de metales debido a su persistencia en las aguas residuales municipales.

- **Cadmio ( $\text{Cd}^{+2}$ ):** Altamente tóxico, elemento no esencial que afecta el crecimiento, el metabolismo y el estado hídrico de las plantas (Divan *et al.*, 2009), una de las causas de su toxicidad es su interacción con otros elementos.

- **Plomo (Pb<sup>2+</sup>):** Elemento no es esencial en los organismos vegetales y puede resultar tóxico. Pb<sup>2+</sup> es bastante inmóvil en el suelo y tiende a acumularse en las raíces, lo que resulta en una escasa translocación en órganos (Sharma y Dubey, 2005).

Para el ensayo de toxicidad se seleccionaron plantas de aproximadamente 10 cm de altura y tres semanas de edad, estas plantas fueron colocadas en recipientes de plástico de PVC (20 cm. de altura y 7 cm. de diámetro), se utilizaron sales de nitrato para la suplementación de Plomo (Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) y cadmio (Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) para obtener concentraciones de 0, 2, 5, 10, 20 y 25 mgL<sup>-1</sup> de cada metal en una solución de agua sintética (Tabla 4). El experimento se realizó durante un mes con el muestreo a los 7, 14, 21 y 28 días, se trabajaron 4 réplicas y en cada muestreo se tomaron muestras de agua y la biomasa total de la planta, durante el experimento la temperatura, el pH y el potencial redox se midieron diariamente, para el caso del pH este fue mantenido a 5.8 durante todos el tiempo.

Tabla 4 Composición del agua residual sintética de acuerdo con Unamuno *et al.*, (2007) utilizada en los ensayos de toxicidad.

Compuesto	mgL <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	202
KNO <sub>3</sub>	517
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	177
NaCl	127
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	64

Se determinaron los parámetros agronómicos (altura, longitud de raíces, densidad radical, peso seco, número de hojas y número de hijuelos), también se determinaron los parámetros bioquímicos.

## 6.7.2 Parámetros Bioquímicos

### *Determinación de Pigmentos Fotosintéticos*

Diez discos de 1 cm de diámetro obtenidos de tejido foliar fresco fueron previamente pesados y colocados en tubos de vidrio con 15 mL de acetona al 80% (V/V), posteriormente se mantuvieron en oscuridad durante 24 horas a 4<sup>o</sup> C; los extractos se filtraron y se analizaron por medio de un espectrofotómetro (Perkin - Elmer UV / VIS) a tres longitudes de onda. Las concentraciones de clorofila total, clorofila A (Chl $\alpha$ ) y la clorofila B (Chl $\beta$ ) se calcularon utilizando la fórmula Welburn y Lichtenthaler, y se expresan en miligramos de pigmento por gramo de hoja (peso fresco).

$$Ca = 12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8}$$

$$Cb = 21.50 A_{646.8} - 5.10 A_{663.2}$$

$$Ca+b = 7.15 A_{663.2} + 18.71 A_{646.8}$$

$$Cx+c = (1000 A_{470} - 1.82Ca - 85.02Cb)/198$$

### *Estimación de Azúcares*

Las muestras de tejido fresco fueron lavadas y cortados en trozos pequeños aproximadamente 0.5 cm, estas muestras se secaron en horno de ventilación forzada a 80°C durante 24 horas para una masa constante. El material secado en el horno fue molido para facilitar la digestión de materia orgánica. Para la estimación de azúcares se utilizó el método del fenol ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956).

### *Extracción de proteínas*

Muestras de tejido vegetal se lavaron cuidadosamente con agua corriente y posteriormente con agua destilada, posteriormente las muestras previamente pesadas se trituraron con nitrógeno líquido y se les añadió un regulador para la extracción de proteínas, que consiste en pH 7.0, Tris - HCl 25 mM, EDTA 2 mM, Ditiotreitól (DTT) 1 mM, Polivinilpirrolidona (PVPP) al 1.5 % (P/V), Fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF)

1,3 mM y Triton X100 al 0.25% (V/V), la proporción del regulador fue 1:1 (V/V) para cada solución y el volumen de buffer se añade en proporción 1:1 (V/P). La extracción se llevó a cabo bajo en frío en un baño de hielo y agitación constante. Después de dos horas, la mezcla se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4 ° C. El sobrenadante se recuperó y se cuantificó por el método de Bradford.

## 6.8 Sistema Hidropónico

Se utilizaron plántulas juveniles *Phragmites australis* de aproximadamente 15 cm de longitud y un mes de edad, las raíces se desinfectaron con etanol durante 20 segundos, después con hipoclorito de sodio al 5% durante 15 minutos y se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril. Las unidades experimentales consistieron en cilindros de cloruro de polivinilo (PVC) de 15 cm de diámetro y 18 cm de longitud (Figura 7). El sistema hidropónico contuvo 1 Kg de granzón previamente lavado con agua corriente y HCl al 2% posteriormente se esterilizó en autoclave (121°C, tres ciclos, 1 hora cada ciclo).

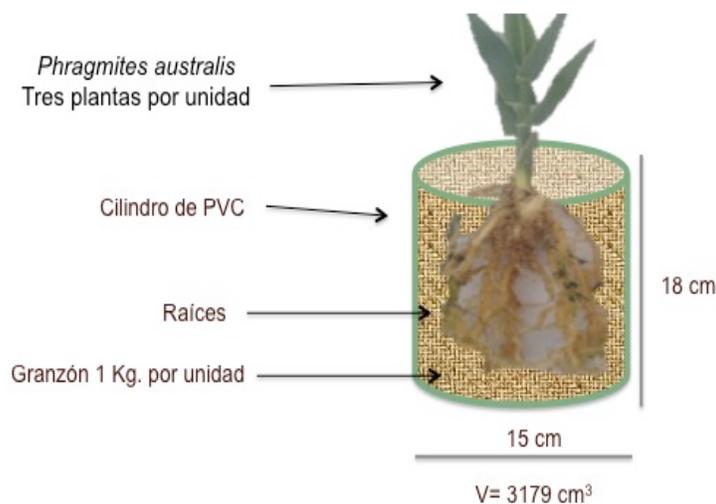


Figura 7 Sistema Hidropónico utilizado en los experimentos de dosificación, en base al diseño propuesto por Solís – Domínguez (2007)

---

### 6.8.1 Dosificación de metales

El experimento consistió en cuatro unidades experimentales sembradas con 3 plántulas de carrizo por unidad. Las plantas se regaron cada tercer día con una solución Long Ashton a pH 5.8, para el aporte de fósforo en la solución nutritiva se utilizaron dos fuentes de fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) y férrico ( $\text{FePO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), para los riegos se estableció un sistema de dosificación. Para la suplementación de metales se utilizaron soluciones de nitrato de cadmio ( $\text{CdSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) y nitrato de plomo ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ). El experimento se realizó en condiciones de invernadero, 19° 09'41" latitud norte, 99° 07'49" longitud oeste, 2,261 msnm, temperatura promedio de 15°C y 38.5°C como máxima, fotoperiodo de 13/11 horas luz/oscuridad, humedad promedio. Para el acondicionamiento del sistema, las plantas recibieron 50 mL de solución sin metal cada tercer día durante los primeros 28 días (14 riegos). Para el sistema de dosificación se establecieron seis concentraciones de metal (0, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100  $\text{mgL}^{-1}$ ) y un control sin metal. Después del acondicionamiento, se adicionó la solución nutritiva con metal durante los siguientes 43 días (22 riegos) y después se incrementó a 100 mL durante 15 días más (8 riegos). Los riegos con la solución nutritiva con metal ( $\text{Pb}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ ) comenzaron al día 28 y las plantas se cosecharon dos días después del último riego (90 días). Durante cada semana se registraron los parámetros agronómicos al final del experimento se determinó la concentración efectiva media, la asimilación de fosfato y la concentración de metales pesados.

---

### 6.8.2 Ensayo de Co-inoculación

El consocio micorrizico se obtuvo a partir de una muestra de suelo rizosférico de acuerdo con la metodología descrita en la sección 6.1.1, posteriormente se establecieron cultivos trampa en macetas de plástico utilizando arena de río estéril como medio de soporte (se esterilizó tres veces a 121° C, tres ciclos, 1 h cada ciclo) y sorgo (*Sorghum sp.*) como planta trampa. Las macetas de propagación se mantuvieron por 4 meses en el invernadero (temperatura promedio mínima de 13°C y 40°C como máxima, fotoperiodo de 14/10 h luz/ oscuridad).La cepa de hongo saprobio aislada también de suelo

rizósferico tomado en el sitio de muestreo; la producción de conidias se realizó en granos de arroz precocido, lavado tres veces con agua potable y manteniéndolo en reposo durante 30 min, en agua a 75 °C, esto de acuerdo a la metodología propuesta por Berlanga- Padilla y Acosta – Díaz (2006).

El experimento consistió en cuatro unidades experimentales en donde se sembraron 3 plántulas de *Phragmites australis* por unidad. Las plantas se regaron cada tercer día con una solución Long Ashton a pH 5.8, para el aporte de fósforo en la solución nutritiva se utilizaron dos fuentes de fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) y férrico ( $\text{FePO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), para la suplementación de metales se utilizó nitrato de cadmio ( $\text{CdSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ).

Los niveles de  $\text{Cd}^{2+}$  que se utilizaron fueron 0 y 50  $\text{mg L}^{-1}$ , los tratamientos fueron los siguientes:

- Tratamiento 1: *P. australis* + Micorriza + Hongo + 50  $\text{mg L}^{-1} \text{Cd}^{2+}$
- Tratamiento 2: *P. australis* + Micorriza + Hongo
- Tratamiento 3: *P. australis* + Micorriza + 50  $\text{mg L}^{-1} \text{Cd}^{2+}$
- Tratamiento 4: *P. australis* + Micorriza
- Tratamiento 5: *P. australis* + Hongo + 50  $\text{mg L}^{-1} \text{Cd}^{2+}$
- Tratamiento 6: *P. australis* + Hongo
- Tratamiento 7: *P. australis* + 50  $\text{mg L}^{-1} \text{Cd}^{2+}$
- Tratamiento 8: *P. australis*

Para el inóculo micorrízico, las esporas que se utilizaron se obtuvieron por el método de tamizado húmedo y decantación de cultivos obtenidos en las macetas de propagación mientras que para la cepa de hongo saprobio se inocularon aproximadamente  $1.7 \times 10^7$  UFC en las raíces de cada planta de los tratamientos correspondientes. El diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar con tres repeticiones. El experimento se realizó en condiciones de invernadero (19°39'41'' latitud norte, 99°07'49'' longitud oeste, 2,261 msnm, temperatura promedio mínima de 11°C y 40°C como máxima, fotoperiodo de 13/11 h luz/oscuridad). Los riegos con la solución nutritiva con  $\text{Cd}^{2+}$  comenzaron al día 28, se adicionó la solución nutritiva con metal durante los siguientes 45 días (23 riegos) y después se incrementó a 100 mL durante 21

días más (10 riegos), las plantas se cosecharon un día posterior al último riego (95 días de edad).

---

### 6.8.3 Análisis de Plantas

#### *Análisis Foliar (Determinación de asimilación de fosfato)*

La determinación de asimilación de fósforo se llevó a cabo mediante el análisis foliar (Sadzawka *et al.*, 2004) el cual se considera referencia indispensable para determinar los estados carenciales de elementos e indican de forma precisa la asimilación de los diferentes elementos debido a que las hojas son muy sensibles a los cambios de composición del medio nutritivo, la concentración de fósforo se determinó a través de espectrofotometría utilizando el método de fosfovanadomolibdato de acuerdo con la metodología descrita en literatura (APHA 1998). y el resultado es reportado en mg P g planta<sup>-1</sup>.

#### *Metales Pesados (Plomo y Cadmio)*

Las muestras de plantas se separaron en raíces y parte aérea se lavaron cuidadosamente para eliminar las partículas de soporte se realizó la medición de parámetros agronómicos (longitud de raíces, tamaño de planta, peso seco); el material vegetal fue secado en un horno a 60 ° C durante 72 h y posteriormente se fraccionó manualmente en un mortero. El material vegetal seco (500 mg) se digirió con 10 mL de ácido nítrico concentrado y 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 20% en un horno de microondas (Mars 5, CEM Corporation, Matthews, NC, E.U.). Mientras que la determinación de Cd se realizó con espectroscopia de absorción atómica.

---

### 6.8.4 Análisis de Raíces

#### *Tinción de raíces*

Para evaluar la presencia de colonización micorrizica en la rizósfera de las plantas de *P. australis* se realizó tinción de raíces con Azul Tripano y la Tinción vital, los resultados se expresan en función del porcentaje de colonización micorrizica.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Etapa 1 Caracterización Rizosférica

#### 7.1.1 Características de Agua y Sedimentos

Los análisis de metales de las muestras de agua y sedimentos se muestran en la Tabla 5 y los valores obtenidos se encuentran por debajo de los límites permisibles en la normativa establecida por la EPA (1993). El suelo rizósferico se caracteriza por ser un suelo franco arenoso (arcilla 8.41%, arena 89.6 % y limo 2 %), el contenido de materia orgánica fue pobre (0.6 a 1.2) mientras que el pH osciló entre 6.67 y 6.73. Los valores totales de fósforo variaron de 20 a 125 mgKg<sup>-1</sup> y fósforo orgánico entre 15 y 85 mgKg<sup>-1</sup>, mientras que Nitrógeno total varió de 830 a 1645 mgKg<sup>-1</sup>. Los valores de pH de las muestras de agua oscilaron entre 6.5 y 8.0, la demanda química de oxígeno (DQO) fue de entre 11.66 y 15 mg O<sub>2</sub>L<sup>-1</sup>, los valores de fósforo total osciló entre 0.88 y 2.34 mgL<sup>-1</sup>, los valores totales de nitrógeno y resultaron alrededor de 8.82 gL<sup>-1</sup>.

Tabla 5 Contenido de metales en el sitio de muestreo

Metales Evaluados	Sedimentos (mg Kg <sup>-1</sup> )	Límites Permisibles en Sedimentos (mg Kg <sup>-1</sup> )	Agua (mg L <sup>-1</sup> )	Límites Permisibles en Agua (mg L <sup>-1</sup> )
Hierro (Fe <sup>3+</sup> )	8419.14	-	2978	-
Manganeso (Mn <sup>2+</sup> )	836.46	-	0.059	-
Calcio (Ca <sup>2+</sup> )	60.63	-	28.62	-
Zinc (Zn <sup>2+</sup> )	60.52	7500	0.1025	5.0
Cobre (Cu <sup>2+</sup> )	9.80	4300	ND	2.0
Niquel (Ni <sup>2+</sup> )	7.85	75	ND	0.2
Cromo (Cr <sup>6+</sup> )	7.81	150	ND	0.1
Plomo (Pb <sup>2+</sup> )	2.125	420	0.1907	0.05
Cadmio (Cd <sup>2+</sup> )	0.521	85	ND	0.01

ND = No detectados. (-) No hay limite en la normatividad para este metal

En los humedales, las raíces de las plantas, además de apoyar el crecimiento y desarrollo de la planta, son el primer contacto con elementos potencialmente tóxicos, los microorganismos son también importantes porque están involucrados en la asimilación de nutrientes por la planta (Stottmeister *et al.*, 2003). Los microorganismos nativos que

han estado expuestos a mayor contaminación han aumentado la tolerancia a los metales en comparación con aquellos que han estado expuestos a una menor contaminación (Valix y Loon, 2003). Por tanto, el aislamiento y la caracterización de los microorganismos en la rizosfera de plantas usadas en la biorremediación ayudará a identificar especies con aplicaciones potenciales de biorremediación. Este estudio se centró en microorganismos que mejoran la solubilización de fosfato y *P. australis*, que ha sido ampliamente utilizado para eliminar el fósforo de humedales contaminados (Vymazal, 2007).

### 7.1.2 Hongos Micorrízicos

Para el aislamiento y caracterización de hongos micorrizicos arbúsculares a partir de muestras de suelo rizósferico se utilizaron las técnicas establecidas en la sección 6.2; a partir de las muestras tomadas en el sitio descrito en la sección 6.1.2 (Figura 8), para cada sitio se determinó la colonización micorrízica en las raíces obtenidas en cada muestreo, se realizaron tres muestreos de suelo rizósferico en los meses de mayo, agosto y noviembre, sin embargo no se obtuvieron diferencias significativas con respecto al porcentaje de colonización de raíces con respecto al tiempo ( $p = 0.001$ ).



Figura 8 Porcentajes de colonización en las muestras obtenidas del sitio evaluado

Para el aislamiento y caracterización del consorcio micorrízico se establecieron los cultivos trampa, utilizando semillas de sorgo, cebolla y lechuga, las semillas de sorgo tuvieron mayor eficiencia de propagación, por lo que se seleccionaron los inóculos obtenidos en sorgo para su caracterización (Figura 9).



Figura 9. Macetas de cultivos trampa utilizando sorgo (*Sorghum sp.*)

El consorcio obtenido en los cultivos trampa se caracterizó cualitativamente de acuerdo a la metodología de observación de esporas al microscopio (Figura 10) de acuerdo a lo descrito por los sitios web <http://www.mycorrhizas.org> y <http://www.amf-phylogeny.com>.

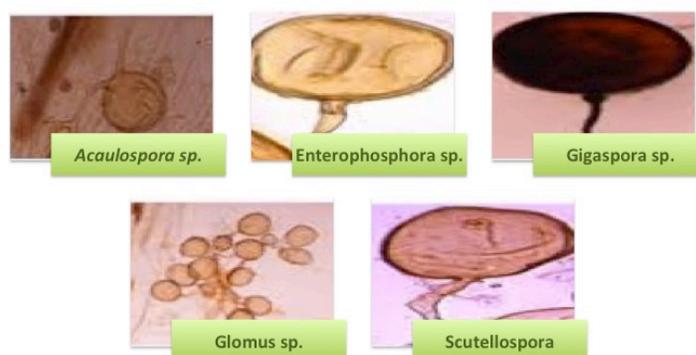


Figura 10. Criterio cualitativo de identificación de esporas de hongos micorrizicos.

El criterio cualitativo de observación al microscopio permitió la identificación de las esporas del consorcio aislado de la rizósfera de *P. australis*, mayoritariamente como miembros del género *Glomus sp.* (Datta y Kulkarni, 2012). En los tres sitios establecidos para el muestreo, se encontraron tres tipos diferentes de hongos micorrizicos, que consiste en tres familias hongos, Glomaceae (Esporas hialinas en racimos), Acaulosporaceae (Esporas café claro o amarillo claro; 186  $\mu\text{m}$  de diámetro) y Gigasporaceae (Esporas Grandes de color café oscuro; 200 a 250  $\mu\text{m}$ ), (Tabla 6).

Tabla 6 Abundancia de Esporas detectadas a través del método cualitativo / cuatitativo de observación al microscopio

Sitio de muestreo	Géneros	Población (Esporas / 100g de suelo)
<b>Anegado</b>	<i>Glomus sp.</i>	30 - 40
	<i>Acaulospora sp.</i>	25 - 30
	<i>Gigaspora sp.</i>	10 - 35
<b>Temporalmente Inundado</b>	<i>Glomus sp.</i>	45 - 75
	<i>Acaulospora sp.</i>	30 - 42
	<i>Gigaspora sp.</i>	15 - 25
<b>Borde Exterior</b>	<i>Glomus sp.</i>	> 100
	<i>Acaulospora sp.</i>	40 - 60
	<i>Gigaspora sp.</i>	50 - 75

De acuerdo con varios autores (Miller, 2000; Carvalho *et al.*, 2001; Bauer *et al.*, 2003; Bohrer *et al.*, 2004; Fuchs y Haselwandter, 2004), la formación de micorrizas varía según la temporada, un factor determinante para el desarrollo de la micorriza parece ser la fenología de la planta, pues se ha demostrado que la mayor colonización se observa durante el periodo de crecimiento de la planta (Carvalho *et al.*, 2001), cuando la planta se somete a períodos de estrés, tales como el corte o la ausencia de humedad, la esporulación del hongo aumenta como un mecanismo de supervivencia (Bohrer *et al.*, 2004).

### 7.1.3 Hongos Solubilizadores de Fosfato

#### *Aislamiento de cepas asociadas a la rizósfera*

A partir de las muestras de suelo rizósferico y las metodologías descritas en la sección 6.3.3 fue posible el aislamiento y caracterización de 5 cepas de hongos con capacidad para solubilizar fosfato tricálcico (Figura 11), las cepas inicialmente fueron denominadas PSFP del 01 al 05 que son las siglas de Phosphate Solubilizer Fungi - *Phragmites*, posteriormente estas cepas fueron identificadas por medio de técnicas de biología molecular.

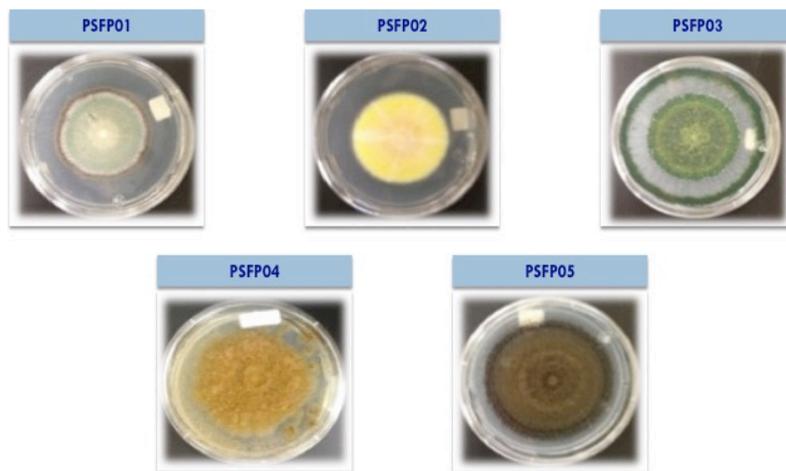


Figura 11. Hongos saprobios aislados del suelo rizósferico de *P. australis* con capacidad para solubilizar fosfato tricálcico, creciendo en agar Pikowskaya modificado después de 16 días.

#### *Identificación Molecular*

Los hongos en este trabajo fueron identificados de acuerdo con las similitudes entre las secuencias parciales obtenidas de las regiones ITS, el primer aislado se identificó como *Penicillium italicum* Wehmer que obtuvo el 100% de similitud con el número de acceso DQ991463.1 reportado por Hernández-Montiel y Ochoa (2007); el segundo aislamiento fue identificado como *Penicillium dipodomyicola* de acuerdo al 100% de similitud con el número de acceso KM458817 reportado por Frisvad, Filt y Wicklow (Mycobank, 2015); el tercer aislado se identificó como *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* Iizuka que obtuvo

el 100% de similitud con el acceso HM140184.1 presentado por Ma *et al.*, (2010); el cuarto aislado se identificó como *Aspergillus niger* que obtuvo un 99% de similitud con el acceso KJ365316, reportado por de Vanaja, Ramalingam y Sanjeeb (NCBI, 2015) , finalmente, el quinto aislamiento fue identificado como un miembro del género *Trichoderma* con 99% de similitud con el acceso EF591763 correspondiente a *Trichoderma atroviride* (NCBI, 2015).

## 7.2 Ensayos *In Vitro*

El análisis de los resultados del diámetro de crecimiento diario (DCD) determinó que existen diferencias significativas en el crecimiento del micelio entre las cepas aisladas de la rizósfera para fosfato tricálcio Ca-P ( $F_0 = 542,34$ ;  $p = 0,000$ ) y para fosfato férrico Fe-P ( $F_0 = 183,24$ ;  $p = 0,000$ ) ; *P. dipodomyicola* registró el crecimiento más lento para los dos fosfatos  $0.4091 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$  para el Ca-P y  $0.2281 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$  para Fe-P. Para el caso de Ca-P, *A. japonicus* mostró el mayor crecimiento ( $0.7772 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$ ), seguido de *A. niger* ( $0.7195 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$ ), y *P. italicum* ( $0.4706 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$ ), por otra parte *A. niger* logró el mayor crecimiento ( $0.7444 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$ ), seguido de *P. italicum* ( $0.5062 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$ ) y *A. japonicus* ( $0.4400 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$ ) para Fe-P. Entre tipo de fosfatos utilizados hubo diferencias significativas en especial para *A. japonicus* ( $F_0 = 303$ ;  $p = 0.000$ ) y *P. dipodomyicola* ( $F_0 = 170.22$ ;  $p = 0.000$ ), mientras que para *P. italicum* ( $F_0 = 4.93$ ;  $p = 0.0682$ ) y *A. niger* ( $F_0 = 1.53$ ;  $p = 0.2619$ ) no se observaron diferencias significativas.

*Aspergillus niger* ha sido reportada por varios autores por su capacidad para solubilizar fosfato (Silva y Vidor, 2001; Maliha *et al.*, 2004; Barroso *et al.*, 2006;. Chuang *et al.*, 2007; Naik *et al.*, 2013;. Yasser *et al.*, 2014), por su parte de las otras cepas evaluadas en este estudio no existen reportes sobre su capacidad in vitro para solubilizar fosfato.

### 7.2.1 Solubilización de fosfato en caja Petri

#### *Indice de Solubilización de Fosfato*

En el tratamiento control, las dos cepas de *Penicillium* obtuvieron los índices más altos de solubilización (*P. italicum* = 1.97; *P. dipodomyicola* = 2.12), en contraste, las cepas de

*Aspergillus* obtuvieron índices más bajos (*A. japonicus* = 0.84; *A. niger* = 1.47) en el caso de *T. atroviride*, no fue posible identificar un halo de solubilización, debido a su rápido crecimiento. Sin embargo, fue posible observar la decoloración de la agar Pikowskaya. La aparición del halo de solubilización puede ser debido a las actividades de los ácidos orgánicos producidos por los hongos (Chen *et al.*, 2005), los ácidos orgánicos de bajo peso molecular son responsables de la disminución del pH en el medio de cultivo (Chaiarn y Lumyong, 2009) y desempeñan un papel muy importante en la solubilización de fosfato.

Las cepas fúngicas con capacidad de solubilización de fosfato por lo general han sido aisladas de suelo rizósferico de plantas de interés agrícola como el maíz, el trigo (Wakelin *et al.*, 2004; Oliviera *et al.*, 2008), melón (Coutinho *et al.*, 2011), maní (Gómez-Guiñan y Zabala, 2001), coliflor, guisantes y mango (Naik *et al.*, 2013) e inclusive el café (Posada *et al.*, 2013); En el estudio de Pérez *et al.*, (2012), *Penicillium sp.* y *Aspergillus niger* fueron las cepas predominantes asociados a la rizósfera del pasto Colosuaña (*Bothriochloa pertusa* (L)) con capacidad para solubilizar fosfato.

Cuatro de las cinco cepas aisladas en este estudio mostraron tener actividad de solubilización de fosfato desde el primer día posterior a la inoculación, sólo en placas P-Ca se observó la formación de los halos alrededor de la colonia. Mediante el uso de tiras reactivas se determinó un pH ácido en la superficie de las placas del medio Pikowskaya, de acuerdo con los valores obtenidos de ISF en las placas de Ca-P, no se observó una diferencia significativa (Fo: 157,38; p = 0,000), de acuerdo con el análisis de medias de Tukey. Entre las especies de *Penicillium* (*P. italicum* = 1.9783 y *P. dipodomycicola* = 1.9383). Sin embargo, hay diferencias significativas entre las especies de *Aspergillus* (*A. niger* (1.4776) y *A. japonicus* (0.8476)). En caso contrario para el Fe-P, no se observaron halos de solubilización, por lo tanto es necesario el uso de medios de cultivo líquidos para la capacidad de solubilización de la cepa, lo mismo sucede con *Trichoderma atroviride*, que pese a observarse el cambio de coloración en el medio Pikowskaya, fue complicado evaluarlo debido al rápido crecimiento de *T. atroviride*.

Los ensayos cualitativos son indicativos de la capacidad para solubilizar fosfato, Hernández - Leal et al. (2011) indica que la ausencia de halos no implica que los microorganismos carecen de capacidad para solubilizar fosfatos, las cuatro cepas ensayadas fueron capaces de solubilizar fosfato tricálcico. Aunque en presencia de fosfato férrico no se presentó solubilización, esto se relaciona con la solubilidad de los compuestos de calcio en comparación con los compuestos de hierro (Barroso y Nahas, 2005).

---

### 7.2.2 Solubilización de fosfato en líquido

Los ensayos de solubilización de fosfato se realizaron en matraz y con medio Pikowskaya líquido de acuerdo a la metodología descrita en la sección 6.5. La concentración inicial de fósforo en el medio de cultivo introducido como  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  fue  $99.88 \text{ mgL}^{-1}$  y  $65.45 \text{ mgL}^{-1}$  para  $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , calculado de acuerdo con su peso molecular. Todas las cepas de hongos fueron capaces de solubilizar ambos fosfatos a diferentes niveles, sin embargo, la mayor solubilización de fosfato se obtuvo con Ca-P. La cepa *P. italicum* obtuvo los valores máximos de P-solubilización con  $94.79 \text{ mg L}^{-1}$  y  $4.24 \text{ mg L}^{-1}$ , para el Ca-P y Fe-P, respectivamente, después de ocho días de cultivo, seguido de *P. dipodomyicola*  $88.7 \text{ mg L}^{-1}$  de Ca-P y  $2.23 \text{ mg L}^{-1}$  de Fe-P, por su parte las especies de *Aspergillus* mostraron los valores más bajos de solubilización, por ejemplo *A. japonicus* presentó  $50.23 \text{ mgL}^{-1}$  en el tratamiento con Ca-P y *A. niger* de  $1.03 \text{ mgL}^{-1}$  con Fe-P. Por lo tanto en los tratamientos con Fe-P, las cepas fúngicas solubilizaron menos cantidad de fósforo en comparación con los tratamientos con Ca-P, en la Tabla 7 se muestran las tasas de solubilización y pH obtenidos para cada día de muestreo. De acuerdo con el análisis estadístico el factor de mayor impacto fue el tipo fosfato (Fo: 382.10 p= 0,0000), la única diferencia significativa se presentó en el caso de la cepa de *A. japonicus* que mostró la menor solubilización en comparación con las otras cepas (Fo: 7.00 p: 0.0023).

Tabla 7 Fósforo soluble y pH en el medio líquido con Ca-P y Fe-P inoculados con hongos aislados de la rizósfera de *P. australis* (  $\bar{x} \pm SD$ ).

Tratamiento	Cepas	Variable	Muestreo (Días)								
			1	2	3	4	5	6	7	8	
Ca-P	<i>P. italicum</i>	P-soluble (mg L <sup>-1</sup> )	9.6 + 0.4883	14.06 + 0.4176	16.91 + 1.25	33.70 + 1.07	37.96 + 0.9739	61.30 + 1.87	91.45 + 0.8618	94.79 + 1.999	
		pH	5.76 + 0.02	5.72 + 0.02	5.37 + 0.01	5.03 + 0.06	5.01 + 0.04	4.85 + 0.06	4.61 + 0.08	4.28 + 0.02	
	<i>P. dipodomycicola</i>	P-soluble (mg L <sup>-1</sup> )	8.40 + 1.28	11.69 + 1.42	14.90 + 0.3494	34.40 + 0.6736	37.42 + 2.37	48.30 + 0.9747	87.56 + 1.36	88.70 + 1.87	
		pH	5.78 + 0.01	5.74 + 0.04	5.39 + 0.03	5.36 + 0.09	5.28 + 0.01	5.14 + 0.06	5.02 + 0.05	4.68 + 0.03	
	<i>A. japonicus</i>	P-soluble (mg L <sup>-1</sup> )	9.06 + 0.4883	12.17 + 0.4883	16.93 + 0.4883	33.64 + 0.4883	35.26 + 0.4883	40.22 + 0.4883	49.64 + 0.4883	50.23 + 0.4883	
		pH	5.72 + 0.03	5.62 + 0.03	5.6 + 0.06	5.47 + 0.03	5.37 + 0.02	5.28 + 0.07	5.09 + 0.01	4.79 + 0.09	
	<i>A. niger</i>	P-soluble (mg L <sup>-1</sup> )	7.4 + 0.4883	7.23 + 0.4883	15.34 + 0.4883	27.67 + 0.4883	37.44 + 0.4883	51.33 + 0.4883	55.07 + 0.4883	56.57 + 0.4883	
		pH	5.61 + 0.09	5.64 + 0.04	5.57 + 0.02	5.44 + 0.04	5.29 + 0.04	5.22 + 0.03	5.17 + 0.02	5.03 + 0.04	
	Fe-P	<i>P. italicum</i>	P-soluble (mg L <sup>-1</sup> )	-	1.11 + 0.1816	1.24 + 0.1708	1.5 + 0.3706	2.08 + 0.0488	2.67 + 0.1943	4.82 + 0.6654	4.23 + 1.771
			pH	5.79 + 0.005	5.74 + 0.04	5.73 + 0.03	5.68 + 0.02	5.56 + 0.03	5.51 + 0.03	5.35 + 0.1	5.11 + 0.1
		<i>P. dipodomycicola</i>	P-soluble (mg L <sup>-1</sup> )	-	0.616 + 0.3307	0.865 + 0.2407	1.14 + 0.1946	1.005 + 0.0703	0.943 + 0.0453	1.93 + 0.4635	2.24 + 0.6534
			pH	5.79 + 0.01	5.78 + 0.005	5.76 + 0.005	5.73 + 0.03	5.67 + 0.005	5.64 + 0.04	5.57 + 0.06	5.45 + 0.04
<i>A. japonicus</i>		P-soluble (mg L <sup>-1</sup> )	-	-	-	0.043 + 0.4883	0.444 + 0.4883	0.636 + 0.4883	1.15 + 0.4883	1.37 + 0.4883	
		pH	5.79 + 0.005	5.77 + 0.02	5.78 + 0.02	5.73 + 0.04	5.71 + 0.01	5.7 + 0.005	5.66 + 0.02	5.65 + 0.04	
<i>A. niger</i>		P-soluble (mg L <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	0.341 + 0.4883	0.469 + 0.4883	0.759 + 0.4883	1.03 + 0.4883	
		pH	5.77 + 0.03	5.77 + 0.04	5.77 + 0.04	5.77 + 0.005	5.75 + 0.02	5.75 + 0.02	5.73 + 0.000	5.71 + 0.02	

El análisis de correlación entre el porcentaje de solubilización de fosfato y el pH se muestra en la Tabla 8, *P. dipodomyicola* presenta el coeficiente de correlación más alto en ambos tratamientos, hay coeficientes con correlaciones positivas en los tratamientos con P-Ca a excepción de la cepa de *A. niger* por otro lado para los tratamientos de P-Fe hay correlaciones negativas entre porcentaje de solubilización y pH. La acidez en el medio y la cantidad de fosfato solubilizado depende de varios factores como son la capacidad del microorganismos (producción de ácidos orgánicos/actividad enzimática), el tipo de fosfato, así como también de las fuentes de carbono y nitrógeno (Barroso y Nahas, 2005; Pradhan y Sukla, 2005; Souchie et al., 2006). La correlación entre la solubilización de fosfato y el decremento del pH obtenido en este estudio corresponde con lo reportado por Rinu y Pandey (2010), Barroso y Nahas (2013) y Naik et al., (2013).

Tabla 8 Correlación entre porcentaje de fósforo soluble y pH en medio líquido con Ca-P y Fe-P inoculados con hongos aislados de la rizósfera de *P. australis*.

Cepa	Tipo de Fosfato	Coefficiente de Correlación	R <sup>2</sup>	Fo	P	Modelo de ecuación
<i>Penicillium italicum</i>	P-Ca	0.9542	0.9105	223.93	0.0000	Y=353.84 – 60.93X
	P-Fe	- 0.8617	0.7425	63.46	0.0000	Y= 57.14 – 9.67X
<i>Penicillium dipodomyicola</i>	P-Ca	0.9194	0.8454	120.29	0.0000	Y=470.39 – 80.95X
	P-Fe	0.8399	0.7059	52.72	0.0000	Y= 40.15 – 8.19X
<i>Aspergillus japonicus</i>	P-Ca	0.9070	0.8227	102.07	0.0000	Y=286.18 – 47.55X
	P-Fe	- 0.8736	0.7632	70.93	0.0000	Y=76.47 – 13.23X
<i>Aspergillus niger</i>	P-Ca	- 0.9572	0.9163	241	0.0000	Y=506.27 – 88.21X
	P-Fe	-0.7878	0.6206	35.99	0.0000	Y=96.71 – 16.72X

El pH es un factor importante por su parte un pH entre 4 y 6 podría ser suficiente para solubilizar P-Ca, sin embargo no ocurre lo mismo en el caso de P-Fe. La disminución en el pH se requiere para lograr una solubilización mayor por lo que la cantidad de fósforo se incrementa con respecto al tiempo. Sin embargo, un aumento en el tiempo de incubación puede resultar en niveles fluctuantes de fósforo que se atribuyen al uso del fósforo por parte del hongo (Deepa *et al.*, 2010 ); con relación con el período de incubación, que fue de ocho días, que es un tiempo suficiente para que las cepas evaluadas solubilizaran P-Ca casi por completo. Por su parte Naik *et al.*, (2013) establecieron periodos de incubación 5, 10 y 15 días, obteniendo una solubilización máxima a los 10 días para *A. niger*, *P. chrysogenum* y *T. viride*, mientras que al día 15, la cantidad de fósforo había disminuido como resultado de la asimilación por parte de hongos. Los resultados de la producción de biomasa de las cepas utilizadas con las diferentes fuentes de fosfato indican que la solubilización es independiente de la producción de biomasa.

#### *Producción de Ácidos Orgánicos*

Durante el seguimiento de la cinética fue posible determinar la producción de ácidos orgánicos (Figura 12) por las cepas fúngicas evaluadas, sin embargo se detectaron diferencias entre los ácidos orgánicos identificados en relación con la fuente de fosfato evaluada; en particular, se determinó que el ácido oxálico fue el ácido orgánico más representativo. En ausencia de fuente de fosfato, *A. niger* alcanzó el nivel más alto de ácido oxálico ( $374.23 \text{ mgmL}^{-1}$ ) en 8 días de evaluación, sin embargo, en esta misma cepa no fue posible identificar la presencia de ácido oxálico en el medio con fosfatos adicionados, con respecto a la comparación entre los fosfatos se observó que los valores de ácido oxálico obtenido con P-Ca son mucho más bajos que los de P-Fe; *Penicillium italicum* registró el valor más alto ( $2.99 \text{ mgmL}^{-1}$ ) después de 7 días de evaluación con P-Ca, mientras que para la misma cepa en medio con P-Fe el valor más alto ( $30.82 \text{ mgmL}^{-1}$ ) se alcanzó a los cuatro días, que es aproximadamente 10 veces mayor en comparación con la obtenida con P-Ca, otro caso similar ocurre con *A. japonicus* que registra el valor más alto ( $203.75 \text{ mgmL}^{-1}$ ) después de tres días de la evaluación en P-Fe mientras que en P-Ca el valor más alto de ácido oxálico para esta cepa fue  $1.81 \text{ mgmL}^{-1}$ .

En el caso del ácido cítrico destaca el caso del tratamiento con P-Fe donde *P. italicum* es la única cepa en la que se detectó ácido cítrico, el valor más alto (28.78 mgmL<sup>-1</sup>) se consiguió en el día tres, en un caso similar detectado en el tratamiento sin fosfato en el que sólo se detectó la producción de ácido cítrico en cepas de *Penicillium*, los valores más altos fueron 16.72 mgmL<sup>-1</sup> obtenido por *P. italicum* en el primer día y 30.82 mgmL<sup>-1</sup> para *P. dipodomyicola* en el séptimo día; para el caso de tratamientos de P-Ca se determinó que la cepa *A. japonicus* el valor más alto de ácido cítrico (133.49 mgmL<sup>-1</sup>) se obtuvo en el tercer día de cultivo.

El ácido glucónico alcanzó niveles de producción más altos en comparación con los ácidos oxálico y cítrico, en ausencia de fosfato sólo fue posible identificar la presencia del ácido glucónico a partir del quinto día para las cepas de *P. dipodomyicola* y *A. niger*; en particular *A. niger* logró su nivel más alto a los cinco días (112.16 mgmL<sup>-1</sup>), el ácido glucónico también fue identificado en el sexto día (17.84 mg mL<sup>-1</sup>), por su parte *P. dipodomyicola* alcanzó el valor más alto (1425.05 g mL<sup>-1</sup>) en el sexto día. Por otro lado en los tratamientos con Ca-P, *P. italicum* alcanzó el valor más alto (1158.35 mgmL<sup>-1</sup>) en el séptimo día, mientras que en los tratamientos con P-Fe, *P. dipodomyicola* obtuvo el valor más alto (846.85 mg mL<sup>-1</sup>) el sexto día.

La generación de ácidos orgánicos contribuye a la caída del pH, como consecuencia a la solubilización de algunas formas de fosfato inorgánico; Scervino *et al.*, (2010) evaluó la capacidad de solubilización de diversas fuentes de fosfato utilizando aislados fúngicos aislados de la rizosfera de plantas de interés agronómico, reportando diferentes patrones de producción de ácidos orgánicos que participan en la solubilización de sales de fosfato, entre ellos, el ácido glucónico (pKa = 3.35 ± 0.35) y el ácido 2-cetoglucónico (pKa = 2.10 ± 0.54) el cual parece ser el agente metabólico más frecuente de solubilización de fosfato mineral (Sauer *et al.*, 2008), otros ácidos orgánicos como ácido acético (pKa = 4.79 ± 0.10), cítrico (pKa = 2.93 ± 0.28), láctico (pKa = 3.91 ± 0.11), propiónico (pKa = 4.79 ± 0.10), glicólico (pKa = 3.74 ± 0.11), oxálico (pKa = 1.38 ± 0.54), málico (pKa = 3.61 ± 0.23), succínico (pKa = 4.24 ± 0.17), fumárico (pKa = 3.15 ± 0.10) y tartárico (pKa = 3.07 ± 0.34), también han sido reportados como solubilizadores de

fosfato (Sharma *et al.*, 2013). Barroso *et al.*, (2006) subrayó la capacidad de *A. niger* para producir ácidos orgánicos que incluyen oxálico, maleico, tartárico, glucónico, cítrico, láctico y succínico, los mismos ácidos se han reportado para especies de *Penicillium* (Vassilev *et al.*, 2004 ; Wakelin *et al.*, 2004).

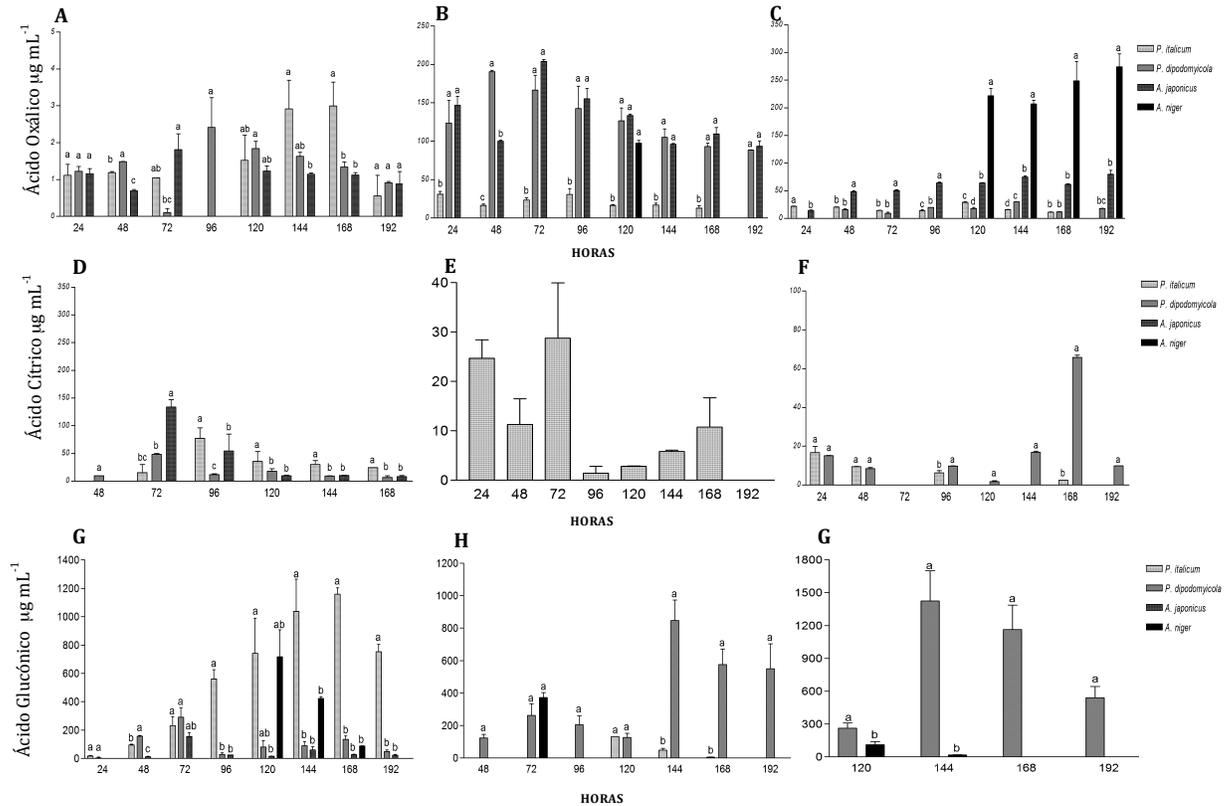


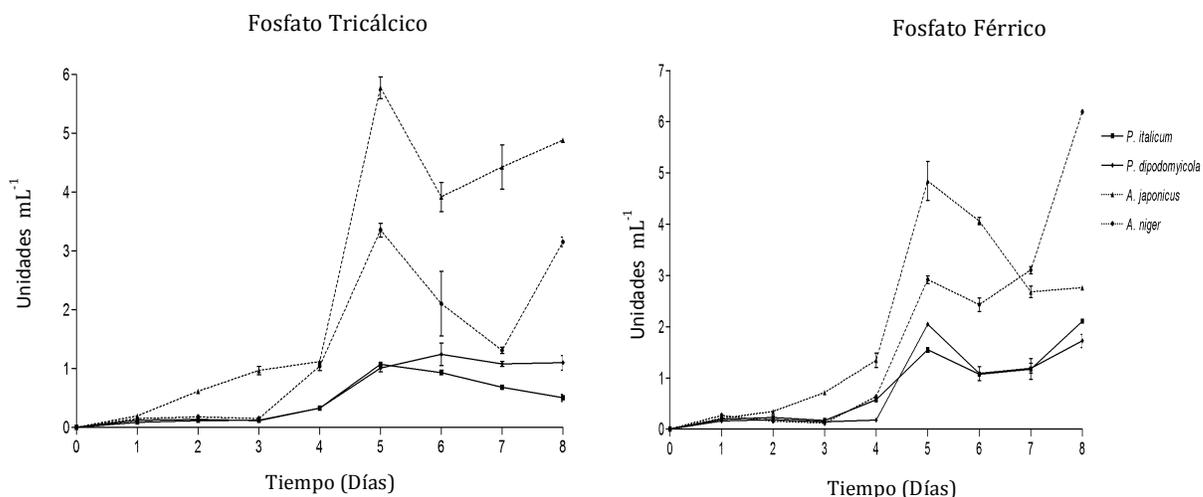
Figura 12. Producción de ácidos oxálico, cítrico y glucónico por hongos aislados de la rizósfera de *Phragmites australis* en medio Pikowskaya líquido con dos diferentes fuentes de fosfato P-Ca (A, D y G), P-Fe (B, E y H) y sin fosfato (C, F y I). Letras diferentes en el mismo día indican diferencia estadística entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

Un pKa menor implica una mayor disociación y por lo tanto efectos más fuertes sobre la reducción de pH (Marra *et al.*, 2015) en nuestro estudio el ácido oxálico y el ácido glucónico mostraron la mayor producción de ácidos orgánicos con las cepas ensayadas. No obstante, la disminución en el pH no fue tan fuerte como se esperaba lo cual sugiere que la solubilización de fosfato férrico está limitada, debido a que no se alcanzó el pH requerido para la solubilización completa. Otras posibles influencias a considerar es la fuente de carbono por ejemplo la D-glucosa, un monosacárido de fácil asimilación, pero

que induce a una baja solubilización de fosfato en comparación con otras fuentes como el manitol o maltosa (Barroso *et al.*, 2006; Nahas, 2007). La actividad de solubilización de fosfato depende no sólo de la caída de pH, sino también de la actividad de las fosfatasas, que se agrupan en condiciones ácidas o alcalinas, en comparación con la fosfatasa alcalina. Las fosfatasas ácidas juegan un papel importante en la solubilización de compuestos inorgánicos de fosfato cuando la rangos de pH varían de ácido a neutro (Deepa *et al.*, 2010).

#### *Actividad Enzimática de Fosfatasa*

La actividad de la fosfatasa ácida (Figura 13), se observó a partir del primer día de la cinética, el incremento de la actividad enzimática y al 5to día para todas las cepas ensayadas y en ambos tratamientos; *A. japonicus* mostró la mayor actividad enzimática (P-Ca: 5.77 unidades mL<sup>-1</sup>, P-Fe: 4.84 unidades mL<sup>-1</sup>), seguido de *A. niger* (P-Ca: 3.35 unidades mL<sup>-1</sup>, P-Fe: 2.91 unidades mL<sup>-1</sup>), *P. dipodomyicola* (P-Ca: 1.009 unidades mL<sup>-1</sup>; P-Fe: 2.05 unidades mL<sup>-1</sup>) y *P. italicum* (P-Ca: 1.07 unidades mL<sup>-1</sup>; P-Fe: 1.55 unidades mL<sup>-1</sup>). Las especies de *Penicillium* mostraron valores más bajos de actividad enzimática en comparación con las especies de *Aspergillus*. Los análisis ANOVA mostraron diferencias significativas para el tratamiento con P-Ca (Fo: 390.95; p = 0.000) en la que existe una similitud entre los géneros, mientras que el tratamiento con P-Fe (Fo : 55.00; p = 0.000) se observó diferencias entre géneros y especies. A partir del quinto día se observó una disminución en la actividad de la enzima fosfatasa a excepción de *A. niger*, cuya actividad aumentó hasta al octavo día (P-Ca: 3.1548; P-Fe: 6.1844); en ambos tratamientos hubo diferencias significativas [P-Ca (Fo: 610.08; p: 0.000) y P-Fe (Fo: 1007.34; p: 0.000)] entre las cepas evaluadas al final de la cinética.



**Figura 13.** Actividades de fosfatasa para cuatro cepas fúngicas en diferentes fuentes de fosfato. Se observó una correlación positiva entre la actividad enzimática de la fosfatasa ácida y la solubilización de fosfato. En el caso de *P. dipodomyicola* se registró un coeficiente de correlación más alto para los tratamientos con P-Ca (0.86;  $R^2$ : 75.42), seguido de ambas especies de *Aspergillus*, *A. japonicus* (0.7840;  $R^2$ =61.48) y *A. niger* (0.6567;  $R^2$ =43.12), mientras que *P. italicum* registró el coeficiente más bajo (0.55;  $R^2$ = 30.30), por otro lado, en los tratamientos con P-Fe, donde se registró menor cantidad de fósforo soluble *A. niger* alcanzó el más alto coeficiente de (0.8786;  $R^2$ =77.19), seguido de *P. italicum* (0.8328;  $R^2$ =69.37) y *A. japonicus* (0.7301;  $R^2$ =53.31) por último *P. dipodomyicola* ha alcanzado el coeficiente más bajo (0.6784;  $R^2$ =46.02) en comparación con las otras cepas ensayadas. La actividad de la fosfatasa de diferentes aislados fúngicos disminuyó gradualmente con el progreso de la incubación, la actividad más alta la fosfatasa ácida se registraron al quinto día de incubación, esta actividad coincide con lo reportado por Naik *et al.*, (2013), la actividad enzimática se indujo sólo en la presencia de la fuente de fósforo insoluble, por lo que el tipo de fósforo tiene influencia sobre la actividad enzimática (Kapri y Tewari, 2010).

### Biomasa

Por último, el tipo de fosfato no tuvo influencia sobre la cantidad de biomasa producida (Fo: 0.55;  $p$ = 0.4669), sin embargo no se observaron diferencias significativas en cuanto

a las cepas evaluadas (Fo: 36.52; p= 0.0000), donde *A. niger* registró el mayor crecimiento (3.16 mg mL<sup>-1</sup>) seguido de *A. japonicus* (2.16 mg mL<sup>-1</sup>) en el caso de especies de *Penicillium* se observó un menor crecimiento 1.63 mgmL<sup>-1</sup> y 1.51 mgmL<sup>-1</sup> para *P. dipodomyicola* y *P. italicum* respectivamente, las dos últimas cepas no mostraron diferencias significativas entre ellos.

---

### 7.2.3 Ensayo Dosis- Respuesta

#### *Inhibición del crecimiento micelial*

Una inspección visual permite evaluar cualitativamente el efecto toxicológico que cada metal ejerce sobre el crecimiento vegetativo, la morfología e incluso la fisiología de los microorganismos. Los metales juegan un papel integral en los procesos biológicos de los microorganismos; por ejemplo metales como cobalto, cromo, cobre, níquel y zinc, son nutrientes esenciales. Sin embargo, algunos metales, como el Al, el Cd y el Pb, no tienen ningún papel biológico y no son esenciales. La contaminación del suelo y el agua por metales pesados pueden conducir a una disminución en la diversidad microbiana, debido a la toxicidad ejercida sobre los microorganismos por dichos metales, sin embargo también es posible identificar a especies que también pudieran ser tolerantes a la presencia de metales pesados. La adición de metales pesados en el medio Pikowskaya inhibe el crecimiento de hongos filamentosos y afecta su morfología. Todos los aislados evaluados en este estudio se caracterizaron por micelios aéreos normales y abundante esporulación. Una amplia gama de cambios morfológicos se observó en los hongos de acuerdo con la Figura (14a y 14b) tales como decoloración o reducción en las densidades del micelio.

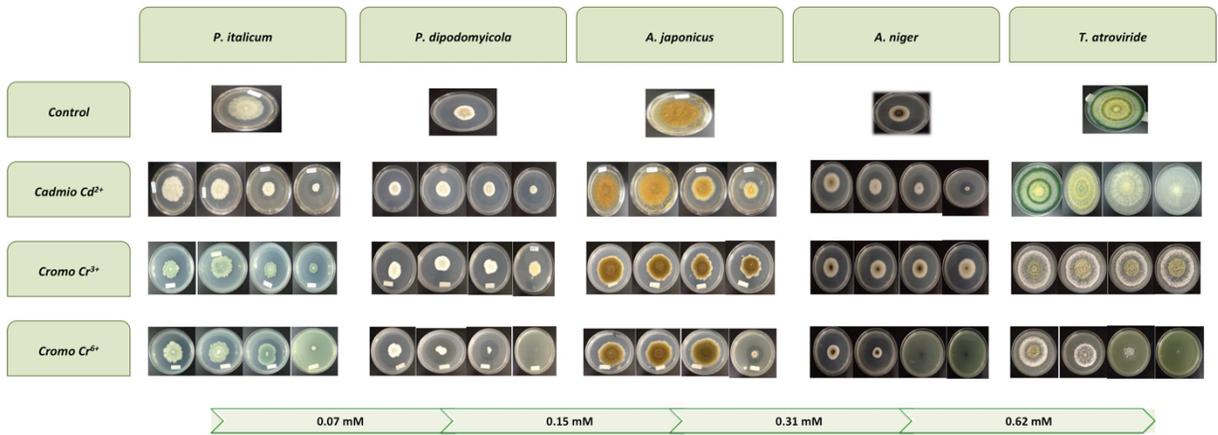


Figura 14a. Ensayo Dosis – Respuesta para Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup> y Cr<sup>6+</sup> a cuatro diferentes concentraciones de 0.07 mM y hasta 0.62 mM

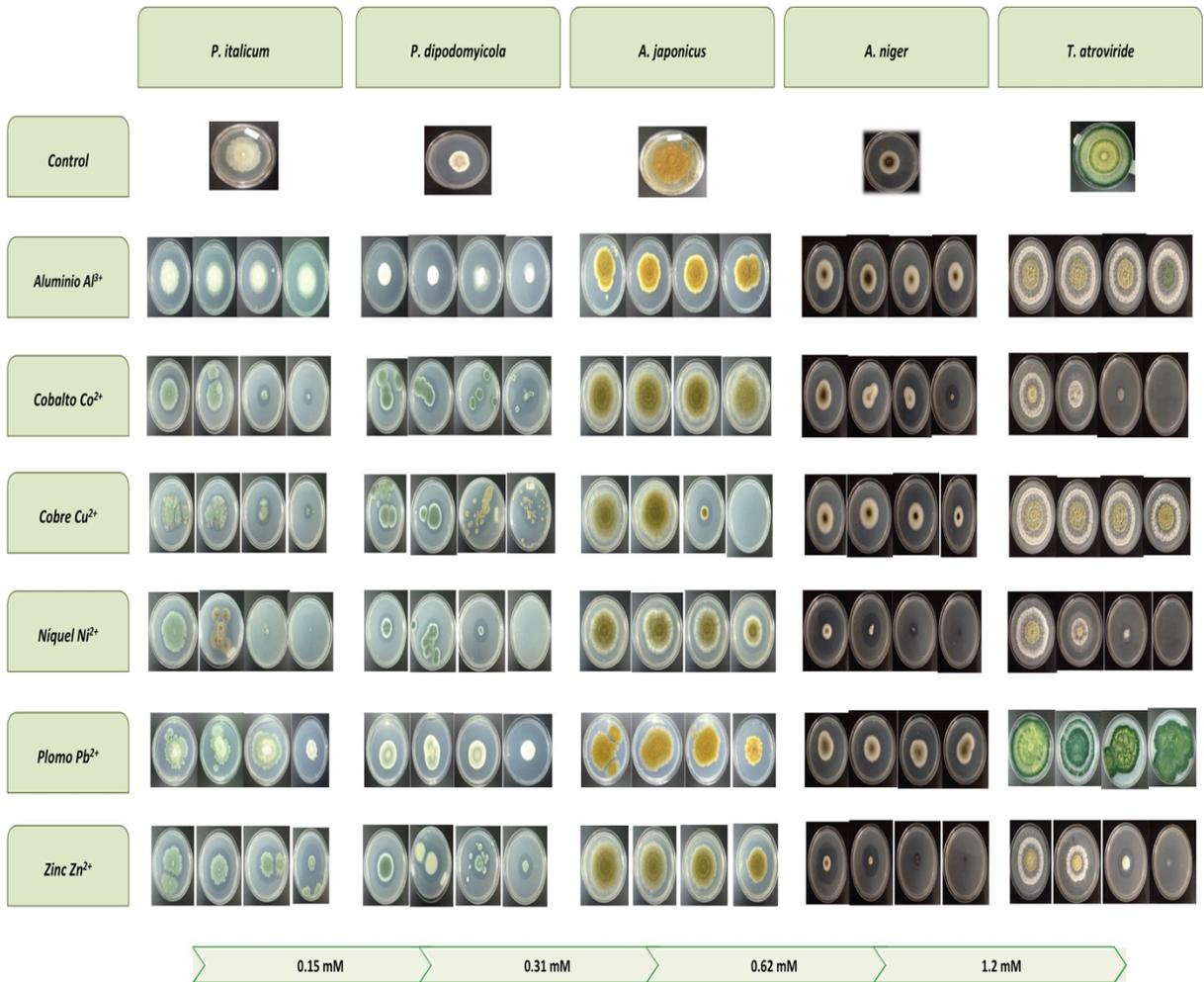


Figura 14b. Ensayo Dosis – Respuesta para Al<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> a cuatro diferentes concentraciones de 0.15 mM y hasta 1.2 mM

Los patrones de crecimiento registradas para cada aislamiento confirman que la capacidad de adaptación y tolerancia dependen del metal que se está evaluando, su concentración en el medio y el microorganismos evaluado, inclusive microorganismos del mismo género pudieran mostrar una marcada diferencia en los niveles de resistencia a metales. Esta tendencia ha sido confirmada por autores como Badar *et al.*, (2000); Bai y Abraham (2003); Malik (2004); Zouboulis *et al.*, (2004), Zafar *et al.*, (2007) y Ezzouhri *et al.*, (2009). El crecimiento vegetativo de los hongos tiende a disminuir a medida que las concentraciones de metales se incrementan. Metales como el Cd y el Cr causaron el 100% de inhibición a concentraciones superiores a 0.62 mM. Este comportamiento fue la razón por la que para el ensayo dosis- respuesta para estos metales se estableció la concentración mínima a 0.075 mM y la máxima a 0.62 mM. Los resultados de las pruebas finales mostraron que, en general, el níquel tuvo el mayor efecto sobre el crecimiento del micelio mientras que el plomo tuvo el menor efecto. Para los metales con mayor efecto tóxicos, las susceptibilidades hongos se establecieron en el siguiente orden  $Cr^{6+} > Cd^{2+} > Cr^{3+}$  (Tabla 9a, Tabla 9b y Tabla 9c).

**Tabla 9a.** Efecto de las concentraciones de cadmio y el cromo sobre el crecimiento de *Trichoderma atroviride*

Metal	Concentración (mM)	DCD(cm <sup>2</sup> día <sup>-1</sup> )	ICM (%)
Cd <sup>2+</sup>	Control	1.4811 e	-
	0.07	2.1222 a	34.1845 a
	0.15	2.0222 b	36.8664 b
	0.31	1.8222 c	47.0057 c
	0.62	1.5667 d	52.2609 d
Cr <sup>3+</sup>	Control	1.4811 a	-
	0.07	1.4722 a	2.2937 a
	0.15	1.3378 b	14.022 b
	0.31	1.3033 bc	16.7561 c
	0.62	1.2889 c	19.2606 d
Cr <sup>6+</sup>	Control	1.4811 a	-
	0.07	1.4744 a	25.6967 a
	0.15	1.2000 b	41.3396 b
	0.31	0.8667 c	65.5807 c
	0.62	0.0333 d	89.736 d

Medias (n=4) con diferente letra entre filas para cada especie indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). DCD (cm<sup>2</sup> día<sup>-1</sup>) = Diámetro de Crecimiento Diario. ICM (%) = Inhibición del crecimiento micelial

**Tabla 9b.** Efecto de las concentraciones de cadmio y el cromo sobre el crecimiento de las cepas del género *Penicillium*.

Metal	Concentración (mM)	<i>Penicillium italicum</i>		<i>Penicillium dipodomycicola</i>	
		DCD(cm <sup>2</sup> día <sup>-1</sup> )	ICM (%)	DCD(cm <sup>2</sup> día <sup>-1</sup> )	ICM (%)
Cd <sup>2+</sup>	Control	0.4706 a	-	0.4091 a	-
	0.07	0.4759 a	17.4753 a	0.2813 b	23.7773 a
	0.15	0.4156 a	28.4001 b	0.3031 b	29.4142 a
	0.31	0.2344 b	51.9429 c	0.2719 b	39.6962 b
	0.62	0.1500 c	67.4395 d	0.2125 c	62.96 c
Cr <sup>3+</sup>	Control	0.4706 a	-	0.4091 a	-
	0.07	0.3938 b	11.6035 a	0.3775 a	7.7720 a
	0.15	0.3575 b	17.9922 b	0.3513 ab	14.247 b
	0.31	0.2752 c	25.2162 c	0.3069 bc	21.080 c
	0.62	0.1881 d	40.3887 d	0.2833 d	25.199 d
Cr <sup>6+</sup>	Control	0.4706 a	-	0.4091 a	-
	0.07	0.3944 b	8.4477 a	0.3503 b	5.9793 a
	0.15	0.3838 b	11.3993 b	0.2832 c	21.8639 b
	0.31	0.3556 c	19.0591 c	0.1597 d	43.8555 c
	0.62	0.0650 d	54.4016 d	0.0644 e	53.6556 d

Medias (n=4) con diferente letra entre filas para cada especie indicant diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). DCD (cm<sup>2</sup> día<sup>-1</sup>) = Diámetro de Crecimiento Diario. ICM (%) = Inhibición del Crecimiento Micelial

**Tabla 9c.** Efecto de las concentraciones de cadmio y el cromo sobre el crecimiento de las cepas del género *Aspergillus*

Metal	Concentración (mM)	<i>Aspergillus japonicus</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
		DCD(cm <sup>2</sup> día <sup>-1</sup> )	ICM (%)	DCD(cm <sup>2</sup> día <sup>-1</sup> )	ICM (%)
Cd <sup>2+</sup>	Control	0.7772 a	-	0.7195 b	-
	0.07	0.6946 b	6.4396 a	1.1610 a	17.2357 a
	0.15	0.6908 b	11.1448 b	1.1215 a	37.0844 b
	0.31	0.4988 c	23.3119 c	0.3400 c	48.2525 c
	0.62	0.3875 d	38.7979 d	0.1793 d	67.8097 d
Cr <sup>3+</sup>	Control	0.7772 a	-	0.7195 b	-
	0.07	0.6188 b	10.009 a	1.2207 a	16.3927 a
	0.15	0.5281 c	22.9883 b	1.2038 a	21.3486 b
	0.31	0.4219 d	28.1812 c	0.5120 c	27.8002 c
	0.62	0.3938 d	33.918 d	0.5033 c	41.2102 d
Cr <sup>6+</sup>	Control	0.7772 a	-	0.7195 a	-
	0.07	0.6031 b	12.8317 a	0.7367 a	39.1753 a
	0.15	0.6000 b	16.1536 a	0.4467 b	62.8194 b
	0.31	0.5531 b	22.0358 b	0.1580 c	83.6691 c
	0.62	0.2000 c	59.1751 c	0.1180 d	86.3461 c

Medias (n=4) con diferente letra entre filas para cada especie indicant diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). DCD (cm<sup>2</sup> día<sup>-1</sup>) = Diámetro de Crecimiento Diario. ICM (%) = Inhibición del crecimiento Micelial

La susceptibilidad de los hongos evaluados con respecto a cada metal fue  $Ni^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Cu^{2+} > Al^{3+} > Pb^{2+}$  (Tabla 10a, Tabla 10b y la Tabla 10c), mientras que *Trichoderma atroviride* registró un ritmo más rápido de crecimiento ( $1.48 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$ ), seguido por *P. italicum* ( $0.47 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$ ), *P. dipodomycicola* ( $0.41 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$ ), *A. japonicus* ( $0.77 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$ ) y *A. niger* ( $0.72 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$ ); *T. atroviride* resultó ser la cepa más susceptible a  $Ni^{2+}$  (91.70%),  $Zn^{2+}$  (91.32%) y  $Cr^{6+}$  (89.73%), sin embargo, presentó inhibición mínima en las concentraciones más bajas de  $Al^{3+}$  (2.57%) y  $Pb^{2+}$  (2.31%).

**Tabla 10a** Efecto de varias concentraciones de metales sobre el crecimiento vegetativo de *Trichoderma atroviride*.

Metal	Concentración (mM)	DCD( $\text{cm}^2 \text{ día}^{-1}$ )	ICM (%)
$Al^{3+}$	Control	1.4811 b	-
	0.15	1.5467 ab	2.5767 a
	0.31	1.6189 a	6.1018 b
	0.52	1.6333 a	7.0788 b
	1.2	1.5400 ab	9.0621 c
	Control	1.4811 a	-
$Co^{2+}$	0.15	1.3233 b	39.6685 a
	0.31	0.8633 c	55.0958 b
	0.52	0.2844 d	85.9295 c
	1.2	0.0133 e	91.4938 d
	Control	1.4811 a	-
	0.15	1.3056 b	9.1705 a
$Cu^{2+}$	0.31	1.2778 b	13.297 b
	0.52	0.9922 c	19.562 c
	1.2	0.9333 c	24.039 d
	Control	1.4811 a	-
	0.15	0.4689 d	2.3179 a
	0.31	1.4244 b	4.1037 b
$Pb^{2+}$	0.52	1.3111 c	8.9551 c
	1.2	1.3178 c	9.4231 d
	Control	1.4811 a	-
	0.15	1.2078 b	26.2666 a
	0.31	1.1244 b	58.2033 b
	0.52	0.7889 c	77.8357 c
$Ni^{2+}$	1.2	0.0400 d	91.7082 d
	Control	1.4811 a	-
	0.15	1.3544 a	18.1378 a
	0.31	1.3020 a	43.4412 b
	0.52	0.9844 b	72.2133 c
	1.2	0.0700 c	91.3262 d

Medias (n=4) con diferente letra entre filas para cada especie indicant diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). DCD ( $\text{cm}^2 \text{ día}^{-1}$ ) = Diámetro de Crecimiento Diario. ICM (%) = Inhibición del Crecimiento Micelial

**Tabla 10b.** Efecto de varias concentraciones de metales sobre el crecimiento vegetativo de cepas de *Penicillium*.

Metal	Concentración (mM)	<i>Penicillium italicum</i>		<i>Penicillium dipodomycola</i>	
		DCD(cm <sup>2</sup> día <sup>-1</sup> )	ICM (%)	DCD(cm <sup>2</sup> día <sup>-1</sup> )	ICM (%)
Al <sup>3+</sup>	Control	0.4706 a	-	0.4091 a	-
	0.15	0.4188 b	15.0097 a	0.3260 b	14.5469 a
	0.31	0.3953 c	25.6266 b	0.2625 c	18.8647 b
	0.52	0.3719 d	31.028 c	0.2600 c	30.8975 c
	1.2	0.3281 e	37.7858 d	0.2467 c	41.8829 d
Co <sup>2+</sup>	Control	0.4706 a	-	0.4091 a	-
	0.15	0.4721 a	19.9692 a	0.4172 a	16.2533 a
	0.31	0.3906 b	41.0734 b	0.3958 a	48.6103 b
	0.52	0.2021 c	57.7582 c	0.2927 b	56.4041 c
	1.2	0.1219 d	65.0162 d	0.1844 c	70.7328 d
Cu <sup>2+</sup>	Control	0.4706 a	-	0.4091 a	-
	0.15	0.4704 a	16.5079 a	0.4313 a	9.5178 a
	0.31	0.4571 a	36.9714 b	0.2763 b	26.9637 b
	0.52	0.0842 b	71.2816 c	0.2754 b	38.8416 c
	1.2	0.0613 b	83.2718 d	0.1850 c	58.2698 d
Pb <sup>2+</sup>	Control	0.4706 a	-	0.4091 a	-
	0.15	0.4613 a	6.2153 a	0.4046 a	6.0319 a
	0.31	0.4842 a	6.2346 b	0.3917 a	9.2568 b
	0.52	0.4792 a	13.3562 c	0.3825 a	16.4644 c
	1.2	0.3581 b	22.2929 d	0.3814 a	20.6114 d
Ni <sup>2+</sup>	Control	0.4706 ab	-	0.4091 a	-
	0.15	0.4779 a	20.3804 a	0.2850 b	41.5937 a
	0.31	0.4400 b	32.4051 b	0.1454 c	61.6933 b
	0.52	0.1663 c	62.4762 c	0.1092 c	71.9743 c
	1.2	0.0583 d	75.6352 d	0.0000 d	99.2767 d
Zn <sup>2+</sup>	Control	0.4706 a	-	0.4091 a	-
	0.15	0.3850 b	13.5356 a	0.3196 b	17.7172 a
	0.31	0.3375 c	15.8981 a	0.2838 bc	35.8732 b
	0.52	0.2095 d	44.3024 b	0.2575 c	43.8441 c
	1.2	0.1942 d	62.369 c	0.1138 d	67.6288 d

Medias (n=4) con diferente letra entre filas para cada especie indicant diferencias significativas (P < 0.05). DCD (cm<sup>2</sup> día<sup>-1</sup>) = Diámetro de Crecimiento Diario. ICM (%) = Inhibición del Crecimiento Micelial.

**Tabla 10c.** Efecto de varias concentraciones de metales sobre el crecimiento vegetativo de cepas de *Aspergillus*.

Metal	Concentración (mM)	<i>Aspergillus japonicus</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
		DCD(cm <sup>2</sup> día <sup>-1</sup> )	ICM (%)	DCD(cm <sup>2</sup> día <sup>-1</sup> )	ICM (%)
Al <sup>3+</sup>	Control	0.7772 a	-	0.7195 a	-
	0.15	0.5979 b	25.0294 a	0.4840 b	19.5403 a
	0.31	0.5573 c	25.372 a	0.4827 b	25.5239 b
	0.52	0.5375 c	32.2219 b	0.4827 b	35.7265 c
	1.2	0.5375 c	40.7088 c	0.4813 b	39.967 c
Co <sup>2+</sup>	Control	0.7772 b	-	0.7195 b	-
	0.15	1.1002 a	6.5956 a	1.1667 a	16.2955 a
	0.31	1.0491 a	15.1096 b	1.1205 a	29.9518 b
	0.52	0.6994 c	18.2769 c	0.3440 c	40.6893 c
	1.2	0.6492 c	32.565 d	0.2000 d	80.8321 d
Cu <sup>2+</sup>	Control	0.7772 c	-	0.7195 c	-
	0.15	1.1085 a	5.3232 a	1.1722 a	12.9310 a
	0.31	1.0428 b	20.6104 b	1.1002 b	26.3821 b
	0.52	0.2971 d	66.1505 c	0.5307 d	37.0950 c
	1.2	0.0288 e	88.6358 d	0.4687 e	52.8538 d
Pb <sup>2+</sup>	Control	0.7772 a	-	0.7195 c	-
	0.15	0.6713 b	8.0739 a	1.1800 a	8.0835 a
	0.31	0.6288 c	11.9516 b	1.1288 b	10.7524 b
	0.52	0.6167 d	16.0902 c	0.6273 d	14.1605 c
	1.2	0.5858 e	19.3518 d	0.5193 e	21.3619 d
Ni <sup>2+</sup>	Control	0.7772 b	-	0.7195 b	-
	0.15	1.0950 a	18.964 a	1.0073 a	56.2522 a
	0.31	1.0693 a	22.9488 a	0.9675 a	83.7548 b
	0.52	0.6375 c	35.4089 b	0.1480 c	85.1441 c
	1.2	0.5667 d	55.407 c	0.0613 c	93.4327 d
Zn <sup>2+</sup>	Control	0.7772 c	-	0.7195 b	-
	0.15	1.1417 a	6.9023 a	1.1800 a	59.4909 a
	0.31	1.0268 b	14.4985 b	1.1288 a	70.3242 b
	0.52	0.6038 d	24.8718 c	0.6273 c	80.7831 c
	1.2	0.5633 d	35.4836 d	0.5193 c	88.7420 d

Medias (n=4) con diferente letra entre filas para cada especie indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). DCD (cm<sup>2</sup> día<sup>-1</sup>) = Diámetro de Crecimiento Diario. ICM (%) = Inhibición del crecimiento Micelial

Los metales son esenciales para el crecimiento de hongos y el metabolismo, pero también pueden ser tóxicos cuando sus concentraciones están por encima de cierto umbral. Esta tendencia fue confirmada en las pruebas para metales como el Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>3+</sup> y Cr. El efecto ejercido por el Ni<sup>2+</sup> es de especial interés pues fue el metal que mostró los porcentajes más altos de inhibición de crecimiento del micelio todos los aislamientos, en el caso de *T. atroviride* se observó un porcentaje de inhibición de 90% en la concentración más alta (1,2 mM) de Ni<sup>2+</sup>. López-Errasquín y Vázquez (2003) reportaron una cepa de *T. atroviride* aislada de los lodos activados de una depuradora de agua fue capaz de tolerar concentraciones de Cu<sup>2+</sup> entre 0 y 300 mgL<sup>-1</sup> y más de 750 mgL<sup>-1</sup> de Zn<sup>2+</sup>, pero hubo una reducción del 50% en la biomasa para Cd<sup>2+</sup> a 125 mgL<sup>-1</sup>. Este último resultado es comparable al obtenido en nuestro estudio donde se observó reducción del 50% a una concentración de Cd<sup>2+</sup> de 108.71 mgL<sup>-1</sup>.

Los porcentajes de inhibición causada por el efecto tóxico de los metales pesados varían dependiendo de las especies fúngicas, además es posible detectar diferencias entre las especies dentro del mismo género. Este comportamiento se observa en los resultados obtenidos para las dos cepas del género *Penicillium* utilizadas en este estudio en presencia de Cu<sup>2+</sup> (Tabla 9b y 10b); *P. italicum* y *P. dipodomyicola* registró 83,27% y 58,27% , de inhibición de crecimiento del micelio, respectivamente, en el caso de las cepas del género *Aspergillus* (Tabla 9c y Tabla 10c), *A. japonicus* y *A. niger* registraron un comportamiento similar 88,63% y 52,8% respectivamente.

*Aspergillus japonicus* fue tolerante a la mayoría de los metales ensayados, sin embargo en presencia de Cu<sup>2+</sup>, se observó mayor inhibición del crecimiento a la concentración más alta. Por su parte el Cu<sup>2+</sup> ha sido reconocido por sus propiedades antimicrobianas (Hofer, 2007), por lo que también se le considera como un fuerte inhibidor del crecimiento de los hongos del suelo. Varios estudios han reportado que las concentraciones efectivas medias para algunos hongos filamentosos (Valix *et al.*, 2001a; Valix *et al.*, 2001b) y hongos ligninolíticos (Baldrian, 2003; Baldrian y Gabriel, 2003), en particular los estudios de Zafar *et al.*, (2007) y Ezzouni *et al.*, (2009) se han enfocado en la tolerancia a metales de varias cepas de hongos aislados de ambientes contaminados.

#### 7.2.4 Determinación de Concentración Efectiva Media (CE<sub>50</sub>)

Zafar *et al.*, (2007) reportó valores de CE<sub>50</sub> que van desde 0.2 a 5 mg mL<sup>-1</sup> para Cd<sup>2+</sup>, seguido de Ni<sup>2+</sup> (0.1 a 4 mg mL<sup>-1</sup>), Cr<sup>6+</sup> (0.3 a 7 mg mL<sup>-1</sup>), Cu<sup>2+</sup> (0.6 a 9 mg mL<sup>-1</sup>) y Co<sup>3+</sup> (0.1 a 5 mg mL<sup>-1</sup>) para *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Trichoderma spp.* y otros aislados de un suelo agrícola que había recibido de descargas de aguas residuales municipales e industriales a largo plazo. Por otra parte Ezzouhri *et al.*, (2009) hace hincapié en que las cepas correspondientes a los géneros *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.* aisladas de sitios contaminadas, resultan ser los más tolerantes a la presencia de metales pesados, algunos de estos microorganismos registran valores de CE<sub>50</sub> que van del 20 al 25 mM para Pb<sup>2+</sup>, de 15 a 20 mM para Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> y de 10 a 15 mM de Cr<sup>6+</sup>, estos valores son altos en comparación con los valores registrados en este estudio, con la excepción de los valores obtenidos para Pb<sup>2+</sup>. La discrepancia entre los resultados obtenidos en este estudio y los reportados por otros autores puede deberse a diferencias en la metodología y los métodos estadísticos utilizados para determinar la CE<sub>50</sub> además factores como las características del sitio contaminado, como el tipo de contaminación, el tiempo de exposición, entre otros influyen sobre la tolerancia de las cepas fúngicas a metales.

Según el análisis Probit, la superposición de los intervalos de confianza mostró que *A. japonicus* (Co<sup>2+</sup> = 3.36 mM, Ni<sup>2+</sup> = 1.095 mM, Zn<sup>2+</sup> = 2.34 mM), *T. atroviride* (Al<sup>3+</sup> = 12.19 mM, Cd<sup>2+</sup> = 0.48 mM, Cr<sup>3+</sup> = 4.51 mM, Cu<sup>2+</sup> = 11.44 mM y Pb<sup>2+</sup> = 50.05 mM) y *P. italicum* (Cr<sup>6+</sup> = 0.677 mM) registraron los valores más altos de CE<sub>50</sub>. Las cepas con una mayor susceptibilidad y los valores más bajos de CE<sub>50</sub> fueron *A. niger* (Cd<sup>2+</sup> = 0.3 mM, Cr<sup>6+</sup> = 0.099 mM, Ni<sup>2+</sup> = 0.098 mM y Zn<sup>2+</sup> = 0.093), *P. italicum* (Cr<sup>3+</sup> = 1.176 mM Cu<sup>2+</sup> = 0.41 mM y Pb<sup>2+</sup> = 8.375 mM), *P. dipodomycicola* (Al<sup>3+</sup> = 2.015 mM) y *T. atroviride* (Co<sup>2+</sup> = 0.22 mM) (Tabla 11a / Tabla 11b). Se registraron los valores más altos CE<sub>50</sub> de Pb<sup>2+</sup> y Al<sup>3+</sup>, mientras que metales como x Cr<sup>6+</sup> y Cd<sup>2+</sup> registraron los valores más bajos de CE<sub>50</sub>.

**Tabla 11a.** Concentración efectiva media para Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup> y Cr<sup>6+</sup> con respecto a la cepa evaluada

Metal	Cepa	CE <sub>50</sub> (mM)	Intervalos de Confianza (mM)	Ecuación Probit	χ <sup>2</sup>
Cd <sup>2+</sup>	<i>P. italicum</i>	0.31	0.283 – 0.348	y = 1.5691x + 0.7936	243.01
	<i>P. dipodomyicola</i>	0.46	0.343 – 0.477	y = 1.1259x + 0.4503	135.06
	<i>A. japonicus</i>	0.26	0.25 – 0.27	y = 2.54 + 4.44x	628.84
	<i>A. niger</i>	0.3	0.271 – 0.338	y = 1.4502x + 0.7554	212.54
	<i>T. atroviride</i>	0.48	0.355 – 0.809	y = 0.5408x – 0.1701	33.93
Cr <sup>3+</sup>	<i>P. italicum</i>	1.176	0.875 – 1.803	y = 1.0273x – 0.0724	94.43
	<i>P. dipodomyicola</i>	3.47	1.914 – 9.618	y = 0.8262x – 0.4354	51.02
	<i>A. japonicus</i>	1.628	1.084 – 3.098	y = 0.8477x – 0.1795	65.21
	<i>A. niger</i>	1.33	0.912 – 2.381	y = 0.82x – 0.1003	65.91
	<i>T. atroviride</i>	4.51	2.38 -13.65	y = 0.8883x – 0.5812	50.21
Cr <sup>6+</sup>	<i>P. italicum</i>	0.677	0.589 – 0.804	y = 1.7076x – 0.2886	218.65
	<i>P. dipodomyicola</i>	0.47	0.419 – 0.531	y = 1.7112x + 0.5652	245.06
	<i>A. japonicus</i>	0.6	0.521 – 0.719	y = 1.5071x + 0.3319	198.77
	<i>A. niger</i>	0.099	0.087 – 0.112	y = 1.6058x + 1.6071	233.21
	<i>T. atroviride</i>	0.176	0.62 – 0.189	y = 2.0326x + 1.5350	363.48

De acuerdo con Rasool y Irum (2014), *A. niger* resulto ser la cepa con mayor capacidad de acumular Pb<sup>2+</sup> en el micelio, *A. niger* fue capaz de crecer a 100 mgL<sup>-1</sup> (o el equivalente a 0.3 mM con Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> como fuente de plomo) sin ninguna inhibición mientras que Muñoz *et al.*, (2012) reporta el aislamiento de cepas de *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. procedentes de muestras de agua y lodos de las plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas e industriales obtuvieron valores de CE<sub>50</sub> que van desde 4 a 14 mM. Otras cepas de *A. niger* evaluadas por Ezzouri *et al.*, (2009) reportaron valores que van desde 25 a 30 mM, mientras que el estudio realizado por Iskandar *et al.*, (2011) identificó una cepa de *A. niger* aislada a partir de un ecosistema de agua dulce, que obtuvo un valor 24 mM. Estos estudios reafirman que la tolerancia de las cepas aisladas varía en función de su origen y las condiciones ambientales. Por su parte Muñoz *et al.*, (2012) reportaron una CE<sub>50</sub> de Pb<sup>2+</sup> para *Penicillium* sp. que osciló entre 6 y 6.5 mM, mientras que Zafar *et al.*, (2007) obtuvieron una CE<sub>50</sub> de entre 7.5 y 10 mM; en este trabajo, las cepas evaluadas del género *Penicillium* mostraron valores de CE<sub>50</sub> mayores comparados con los de otros estudios, con valores de 8.3 y 10.5 mM para *P. italicum* y *P. dipodomyicola*, respectivamente.

**Tabla 11b.** Concentración efectiva media para cada metal con respecto a la cepa evaluada

Metal	Isolate	MEC <sub>50</sub> (mM)	Confidence Intervals (mM)	Probit Equation	$\chi^2$
Al <sup>3+</sup>	<i>P. italicum</i>	2.825	1.866 – 5.597	y = 0.4511x – 0.3437	54.95
	<i>P. dipodomyicola</i>	2.015	1.517 – 3.041	y = 0.9878x – 0.3005	88.83
	<i>A. japonicus</i>	4.32	2.21 – 18.077	y = 0.5073x – 0.3224	26.62
	<i>A. niger</i>	2.51	1.653 – 5.097	y = 0.6974x – 0.2788	48.51
	<i>T. atroviride</i>	12.19	20.03 – 119865	y = 0.5864x – 1.3533	14.44
Co <sup>2+</sup>	<i>P. italicum</i>	0.525	0.47 – 0.589	y = 0.3792x + 1.3536	184.88
	<i>P. dipodomyicola</i>	0.473	0.430 – 0.521	y = 1.5506x + 0.5044	232.62
	<i>A. japonicus</i>	3.36	2.36 – 5.69	y = 1.0889x – 0.5733	85.85
	<i>A. niger</i>	0.589	0.544 -0.614	y = 1.9713x + 0.4533	334.19
	<i>T. atroviride</i>	0.22	0.198 – 0.241	y = 1.9614x + 1.2893	303.83
Cu <sup>2+</sup>	<i>P. italicum</i>	0.41	0.382 – 0.441	y = 2.1974x + 0.8490	405.07
	<i>P. dipodomyicola</i>	0.88	0.786 – 1.007	y = 1.5901x + 0.0877	218.45
	<i>A. japonicus</i>	0.5	0.474 - 526	y = 3.3083x + 0.9983	593.58
	<i>A. niger</i>	1.06	0.909 – 1.287	y = 1.288x – 0.0328	152.93
	<i>T. atroviride</i>	11.44	5.175 - 52.22	y = 0.7021x - 0.7431	37.12
Pb <sup>2+</sup>	<i>P. italicum</i>	8.375	4.6 – 23.04	y = 0.9579x – 0.8842	54.83
	<i>P. dipodomyicola</i>	10.57	5.21 – 37.53	y = 0.84x – 0.8599	44.97
	<i>A. japonicus</i>	32.93	9.66 – 552.58	y = 0.5883x – 0.8927	24.12
	<i>A. niger</i>	20.08	7.51 – 150.56	y = 0.6771x – 0.8821	31.36
	<i>T. atroviride</i>	50.05	13.32 – 1106	y = 0.7696x – 1.3079	23.38
Ni <sup>2+</sup>	<i>P. italicum</i>	0.47	0.433 – 0.514	y = 1.7903X + 0.5848	298.72
	<i>P. dipodomyicola</i>	0.22	0.194 – 0.236	y = 1.9991x + 1.332	293.94
	<i>A. japonicus</i>	1.095	0.921 – 1.37	y = 1.1541x – 0.0455	129.57
	<i>A. niger</i>	0.098	0.078 – 0.12	y = 1.4353x + 1.4483	150.82
	<i>T. atroviride</i>	0.27	0.251 – 0.295	y = 2.2161x + 1.2482	378.79
Zn <sup>2+</sup>	<i>P. italicum</i>	0.81	0.739 – 0.918	y = 1.7384X – 0.1522	259.89
	<i>P. dipodomyicola</i>	0.64	0.575 – 0.723	y = 1.4384x + 0.2781	200.74
	<i>A. japonicus</i>	2.3416	1.8 – 3.4	y = 1.2195x – 0.4506	110.67
	<i>A. niger</i>	0.093	0.064 – 0.121	y = 1.0703x + 1.1039	101.05
	<i>T. atroviride</i>	0.354	0.331 – 0.378	y = 2.5024x + 1.1273	465.02

Varios estudios se han centrado en la tolerancia de diversas especies de hongos a Cu<sup>2+</sup>, en este trabajo, *A. niger* obtuvo una CE<sub>50</sub> de 1.06 mM, por su parte Iskandar *et al.*, (2011) reporta que *A. niger* y *Penicillium simplicissimum* fueron capaces de sobrevivir a 1000 mg L<sup>-1</sup> de Cu<sup>2+</sup> suplementado en PDA, así mismo Price *et al.*, (2001) proporciona evidencia de que la sorción es el mecanismo utilizado por *A. niger* para remover el Cu<sup>2+</sup> reportando una concentración superior a 20 mM requerido para una inhibición del crecimiento de *A. niger*.

### 7.2.5 Índice de Tolerancia

Los índices de tolerancia de metal para los cinco aislamientos seleccionados se muestran en la Figura 15, los índices de tolerancia disminuyeron a medida que la concentración de cada metal aumenta esta tendencia se ha confirmado previamente a través de los valores obtenidos de  $CE_{50}$ , de acuerdo con estos resultados, todos los aislamientos evaluados resultaron en su mayoría tolerantes al  $Pb^{2+}$  (*P. italicum* = 0.77, *P. dipodomyicola* = 0.79, *A. japonicus* = 0.8, *A. niger* = 0.79 y *T. atroviride* = 0.9), pero resultaron menos tolerantes al  $Ni^{2+}$  (*P. italicum* = 0.16, *P. dipodomyicola* = 0.007, *A. niger* = 0.067, *T. atroviride* = 0.08), a excepción de *A. japonicus* que resultó relativamente tolerante de todos los metales evaluados de acuerdo con los valores obtenidos de  $CE_{50}$ .

Las tasas de tolerancia para cada cepa dependen del metal y su concentración, las clasificaciones de tolerancia para las concentraciones de metales más altas y para cada especie fueron *P. italicum*:  $Pb^{2+} > Al^{3+} > Co^{2+} > Zn^{2+} > Cu^{2+} > Ni^{2+}$ , *P. dipodomyicola*:  $Pb^{2+} > Al^{3+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+}$ , *A. japonicus*:  $Pb^{2+} > Co^{2+} > Zn^{2+} > Al^{3+} > Ni^{2+} > Cu^{2+}$ , *A. niger*:  $Pb^{2+} > Cu^{2+} > Al^{3+} > Co^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+}$  y *T. atroviride*:  $Pb^{2+} > Al^{3+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+}$ . Para los metales más tóxicos, las especies de *Penicillium* fueron más tolerantes con respecto al cromo quedando de la siguiente  $Cr^{3+} > Cr^{6+} > Cd^{2+}$ , pero para el caso de las especies de *Aspergillus* y *T. atroviride* el orden de tolerancia a los metales más tóxicos fue  $Cr^{3+} > Cd^{2+} > Cr^{6+}$ .

El índice de tolerancia (Figura 15) refleja la capacidad de cada una de las cepas para mantener su crecimiento con respecto a al incremento de las concentraciones de los metal, la capacidad de supervivencia fúngica depende de varios mecanismos (Anahid *et al.*, 2011). Por lo tanto, nuestro estudio se basó en el hecho de que la exposición prolongada a los metales pesados puede causar cambios considerables en las poblaciones microbianas presentes en el ambiente, reduciendo su número y por lo tanto su actividad, los microorganismos expuestos a los metales pesados muestran adaptación fisiológica, lo que resulta en el desarrollo de mecanismos de tolerancia a la presencia de contaminantes.

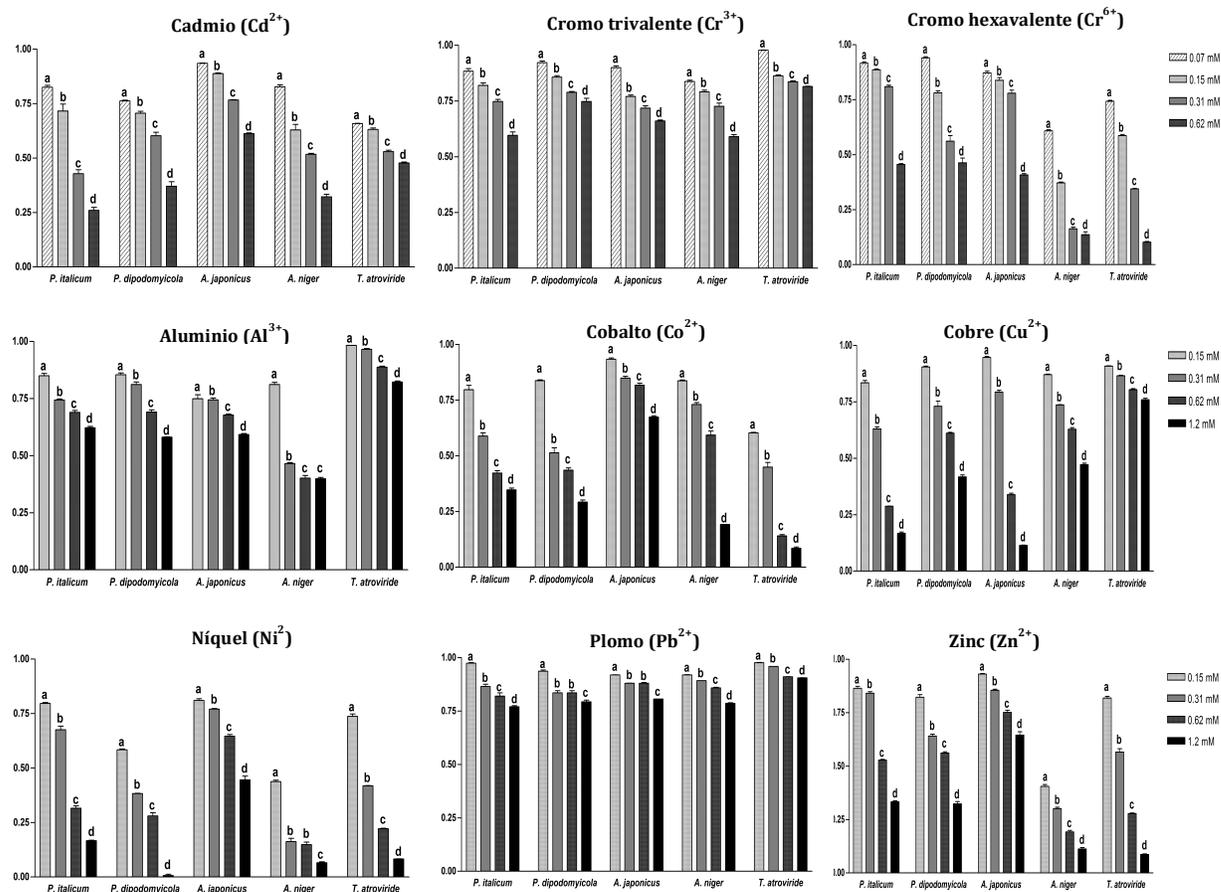


Figura 15. El Índice de Tolerancia de cinco cepas de fúngicas aisladas de la rizósfera de *Phragmites australis* en presencia de metales a cuatro concentraciones. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí ( $n = 4$ , media  $\pm$  SEM,  $\alpha < 0,01$ ).

Ezzouri et al. (2009) mostró que sólo *Penicillium sp.* es capaz de crecer en  $Cd^{2+}$ , sin embargo, Zafar et al., (2007) reportó valores de  $CE_{50}$  para diferentes cepas aisladas de suelos agrícolas, estos fueron 0.7 a 4  $mg\ mL^{-1}$  (equivalente de 3.09 hasta 17.66  $mM$ ) para *Aspergillus sp.*, 5  $mg\ mL^{-1}$  (equivalente a 7.22  $mM$ ) para *Penicillium sp.* y 3  $mg\ mL^{-1}$  (equivalente a 13.24  $mM$ ) para *Trichoderma sp.*, todos estos valores fueron mayores a los obtenidos en este estudio. La tolerancia de hongos saprobios a  $Cd^{2+}$  se asocia con mecanismos de adsorción que dependen de los grupos funcionales en las paredes celulares fúngicas tales como carbonilos, hidroxilos y amidas, que son responsables de la unión de metales durante el proceso de biosorción (Xu et al., 2012).

Levinskaite *et al.*, (2012), estudiaron la respuesta de los hongos saprobios al cromo hexavalente, y reporta que *Trichoderma viride* y *Penicillium chrysogenum* fueron las cepas más tolerantes a  $\text{Cr}^{6+}$  a una concentración de 2 mM, por su parte Zafar *et al.*, (2007) reporta concentraciones que oscilaron entre 0.3 a 7  $\text{mg mL}^{-1}$  (equivalente a partir de 0,50 a 11.89 mM) para aislamientos de *Penicillium sp.* y *Aspergillus sp.*, estas cepas también fueron tolerantes al  $\text{Cr}^{6+}$  para concentraciones de 10 y 15 mM, respectivamente. Ginn *et al.* (2006) propusieron que los efectos tóxicos de los metales pesados sobre el crecimiento de los microorganismos son en función de la concentración de metales pesados y también dependen del tiempo de contacto acumulativo.

Una posible explicación para esto podría ser que las cepas fúngicas mejoran sus mecanismos de sorción conforme la concentración de metales pesados se incrementa (Muñoz *et al.*, 2012), por otra parte se observó que el crecimiento micelial disminuye a medida que la concentración de metales aumentó, mientras el índice de tolerancia y los valores  $\text{CE}_{50}$  confirmó el efecto toxicológico ejercido por los metales. Sin embargo, los impactos fisiológicos y metabólicos asociados con la presencia de estos metales necesitan ser establecidos. Según Baldrian (2003), los metales pesados en el medio ambiente pueden interactuar directamente con enzimas extracelulares producidas por hongos, sin embargo, para que se produzca una respuesta fisiológica, los metales pesados deben ser asimilados por el hongo.

---

### 7.2.6 Índice de Solubilización de Fosfato

La figura 16 muestra el índice de solubilización de fosfato (ISF) obtenido para cada cepa, sin embargo, para ciertos metales el índice no pudo calcularse, por ejemplo para el caso del  $\text{Cr}^{6+}$  para *P. dipodomyicola* y *A. niger*, el  $\text{Cu}^{2+}$  para *A. japonicus* y  $\text{Ni}^{2+}$  para *P. italicum*. En particular, *P. italicum* registró el mayor ISF de todas las cepas evaluadas, los cuales fueron 4.74 a la concentración de 0.62 mM con  $\text{Cr}^{3+}$ . *Penicillium dipodomyicola* (3.35) y *A. niger* (3.56) registraron su mayor ISF para  $\text{Cd}^{2+}$  en la concentración de 0.62 mM, y por último, *A. japonicus* registró su ISF más alto (2.22) para  $\text{Cr}^{6+}$  a la concentración de 0.62 mM.

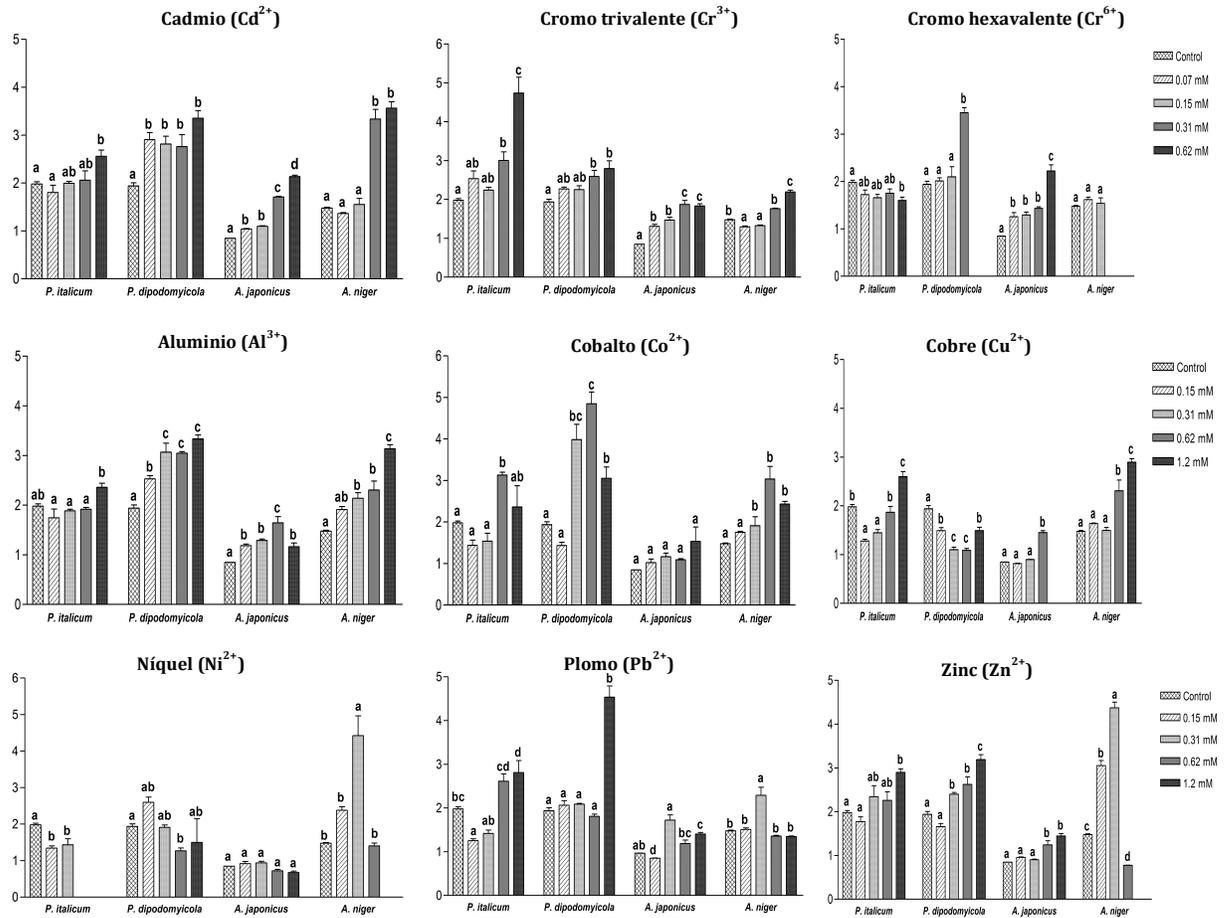


Figura 16. Índice de solubilización de fosfato de cuatro cepas fúngicas aisladas de la rizósfera de *Phragmites australis* en presencia de metal. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí ( $n = 4$ , media  $\pm$  SEM,  $\alpha < 0,01$ ).

El incremento en las tasas de solubilización de fosfato en los tratamientos suplementados con metales pesados indica que la producción de ácidos orgánicos por parte de los hongos mantiene activa la capacidad de solubilización de fosfato pese de la disminución del crecimiento micelial (Walpola y Yoon, 2013), por lo tanto, aunque la acción de los ácidos orgánicos parece ser un factor de suma importancia, pudieran existir otros factores implicados en la solubilización de fosfato (Rashid *et al.*, 2004).

Los mecanismos microbianos utilizados para solubilizar fosfato incluyen la acidificación, quelación y reacciones de intercambio (Chai *et al.*, 2011), fueron influenciados por las condiciones nutricionales, los efectos de estos factores y sus interacciones con los metales pesados también deben ser considerados al analizar la habilidad de

solubilización de fosfato de los hongos. En este estudio se asoció la reducción de biomasa fúngica con el incremento de la capacidad de solubilización (Vig *et al.*, 2003). La aparición del halo de solubilización en los medios sólidos sugiere que los hongos bajo estrés por metales pesados pueden destinar la energía del crecimiento hacia las funciones metabólicas (Muhammad *et al.*, 2005), lo cual puede explicar por qué los hongos fueron capaces de mantener su capacidad de solubilización a pesar de la inhibición del crecimiento; por lo que el ISF aumenta a pesar de que el crecimiento micelial disminuye.

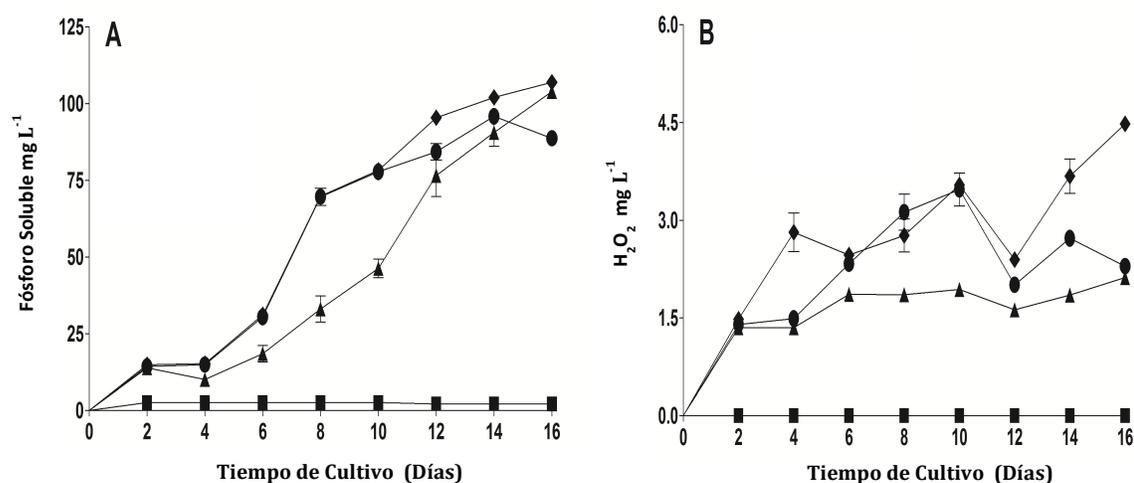
Los efectos toxicológicos se determinaron cualitativamente mediante el cálculo de los valores de ISF, que se incrementaron al disminuir el crecimiento micelial, por otro lado la aparición del halo está relacionada con la interacción entre los ácidos orgánicos producidos por el hongo, cuya generación se estimuló con la presencia de metales pesados (Gadd, 2010). Los ácidos orgánicos permiten a los hongos su adaptación frente a los metales pesados, principalmente a través de la capacidad de estos compuestos para quelar a los metales pesados. A partir del medio de cultivo líquido permiten determinar cuantitativamente el efecto de los metales pesados sobre la habilidad de solubilización de fosfato de los hongos. De las cinco cepas fúngicas evaluadas, *T. atroviride* fue la cepa más tolerante a los metales evaluados, con excepción del  $\text{Co}^{2+}$ , sin embargo no fue posible calcular su índice de solubilización de fosfato. Por otra parte *Penicillium* y *Aspergillus* mostraron valores moderados de  $\text{CE}_{50}$  y altas actividades de solubilización de fosfato siendo *P. italicum* el que tuvo el mayor valor de ISF.

---

### 7.2.7 Peróxido de Hidrógeno y Solubilización de Fosfato

Para comprobar la relación entre la producción de peróxido de hidrógeno y la solubilización de fosfato, se seleccionaron las dos cepas de *Penicillium* y la de *A. japonicus*, debido a su mayor capacidad de solubilización de fosfato. Los experimentos se llevaron a cabo en fosfato tricálcico y el metal seleccionado fue el  $\text{Cd}^{2+}$ , debido al efecto toxicológico ejercido por este metal sobre la fisiología de las especies fúngicas evaluadas.

Todas las cepas evaluadas fueron capaces de solubilizar fosfato tricálcico a diferentes velocidades (Figura 17 A); *P. italicum* y *A. japonicus* presentaron los valores máximos de solubilización de fosfato con 107.0 y 104.0 mgL<sup>-1</sup>, respectivamente después de 16 días de incubación, ambos hongos fueron capaces de solubilizar el 100% del contenido inicial de fosfato introducido como Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Por otra parte la Figura 17 (B) muestra la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por las cepas evaluadas luego de 16 días de incubación. *Penicillium italicum* presentó diferencias significativas (p <0.05) y mayor producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.3 a 4.4 mgL<sup>-1</sup>) en comparación con las otras cepas evaluadas en el periodo de 12 a 16 días de incubación. Se utilizó el análisis de correlación de Pearson para determinar la relación entre solubilización de fosfato y la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por SBM, con el fin de verificar la participación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la liberación de fósforo. *Penicillium italicum* mostró un coeficiente de correlación significativo más alto (0.71) en comparación con *A. japonicus* (0.63) y *Penicillium dipodomyicola* (0.65).



**Figura 17.** Solubilización de fosfato (A) y producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B) por *A. japonicus* (▲), *P. italicum* (◆), *P. dipodomyicola* (●) y control (■) en medio Pikowskaya modificado.

*Penicillium italicum* fue elegido para la implementación de un diseño factorial para evaluar el efecto de Cd<sup>2+</sup> en la solubilización de fosfato. Los resultados de 20 experimentos se utilizaron para obtener tres modelos matemáticos (Tabla 11), cada uno obtiene a partir de la Ec. 1 a través del estudio de los coeficientes parciales de cada factor

y las interacciones entre los factores. Los modelos ajustados fueron diseñados para explicar la relación entre los factores independientes y las respuestas dependientes.

#### Ecuación 1

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Donde  $\beta_0$  es el término constante,  $\beta_i$  y  $\beta_{ij}$  son los coeficientes de regresión,  $\varepsilon$  es el error,  $x_i$  son las variables y  $n$  su número.

#### *Solubilización de fosfato*

El modelo matemático para la solubilización de fosfato permite definir la composición óptima de los medios de cultivo y evaluar los efectos combinados de los factores estudiados. Además, las respuestas predichas (Figura 18 y Figura 19), así como los valores residuales entre los datos experimentales y teóricos se calcularon (Figura 20-A). El ANOVA para la solubilización de fosfato para *P. italicum* se muestra en la Tabla 12, los datos teóricos mostraron una relación funcional con los datos experimentales, lo cual indica que la predictibilidad del modelo es significativa a un nivel de confianza del 95%. El coeficiente de correlación ( $R^2$ ) fue de 80.26% mostró que la ecuación 2 fue altamente confiable. La Figura 18 muestra los valores de las respuestas observadas frente a los del modelo estadístico de la ecuación 2.

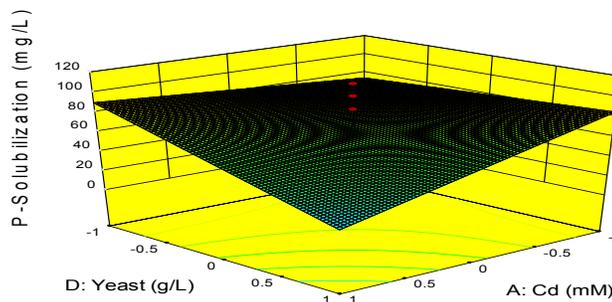
**Tabla 12.** Valores para solubilización de fosfato, peróxido de hidrógeno y producción de biomasa por *P. italicum* de acuerdo a un diseño factorial 2<sup>4</sup>.

Variables independientes				Variables de Respuesta		
Cd <sup>2+</sup> (X1)	G (X2)	N (X3)	Y (X4)	Y1	Y2	Y3
-1	-1	-1	-1	55.23	2.7	1.92
1	-1	-1	-1	56.99	2.61	1.41
-1	1	-1	-1	80.13	2.87	3.63
1	1	-1	-1	75.95	2.88	4.22
-1	-1	1	-1	65.99	2.8	1.5
1	-1	1	-1	100.85	2.73	1.98
-1	1	1	-1	73.86	2.79	5
1	1	1	-1	103.91	2.95	2.95
-1	-1	-1	1	73.38	2.77	2.23
1	-1	-1	1	0	2.75	0.53
-1	1	-1	1	76.11	3.04	5.14
1	1	-1	1	0	3.06	0.68
-1	-1	1	1	88.64	2.16	2.02
1	-1	1	1	48.48	2.84	1.09
-1	1	1	1	80.29	2.96	5.43
1	1	1	1	23.58	3.23	0.95
0	0	0	0	85.43	2.99	2.76
0	0	0	0	98.44	2.95	2.61
0	0	0	0	110.49	2.85	3.68

Y1 = Solubilización de Fosfato, Y2 = Producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Y3 = Producción de biomasa

$$Y1_{\text{P-solubilización}} = 68.30 - 11.49 \cdot \text{Cd} + 1.52 \cdot \text{G} + 10.49 \cdot \text{N} - 13.90 \cdot \text{Y} - 19.30 \cdot \text{Cd} \cdot \text{Y} \quad (2)$$

Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 P-Solubilization (mg/L)  
 ● Design points above predicted value  
 110.49  
 0  
 X1 = A: Cd  
 X2 = D: Yeast  
 Actual Factors  
 B: Glucose = 0  
 C: Ammonium = 0



**Figura 18.** Análisis gráfico de la interacción Cd<sup>2+</sup> y levadura para solubilización de fosfato obtenidos a través del análisis con Design-Expert Software.

**Tabla 13.** Análisis ANOVA para la solubilización de fosfato por *Penicillium italicum* usando un diseño factorial 2<sup>4</sup>

Efectos	Estimado	p value	SS	df	MS	F
Efectos Principales						
Cd	-11.49	0.04	2113	1	2113.01	44.47
G	1.52	0.76	36.81	1	36.81	0.77
N	10.49	0.05	1760.01	1	1760.01	37.04
Y	-13.9	0.02	3092.19	1	3092.19	65.08
Interacción de factores						
Cd × N	7.5	0.15	899.25	1	898.25	18.93
Cd × Y	-19.3	0.002	5961.77	1	5961.77	125.47
G × N	-4.31	0.38	296	1	296.79	6.25
G × Y	-5.33	0.29	454.86	1	454.86	9.57
Error			314.16	1		
Total SS			18209.664	18		

<sup>a</sup>SS = Suma de cuadrados; df = grados de libertad; MS = cuadrado medio; R<sup>2</sup> = 0.803; coeficiente de variación (%) = 27.76; Cd = Cd<sup>2+</sup>; G = glucosa; N = nitrato de amonio; Y = Extracto de Levadura. Los números en itálicas representan las respuestas de los factores que tienen un efecto significativo en la solubilización de fosfato por *P. italicum*.

#### *Producción de Peróxido de Hidrógeno*

De acuerdo con el análisis ANOVA, la glucosa tiene un efecto significativo sobre la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p = 0.002); los otros factores estudiados y sus interacciones no mostraron efectos significativos. La producción más alta de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3.23 mgL<sup>-1</sup>) se observó bajo las condiciones de las concentraciones altas de cadmio Cd<sup>2+</sup> (0.45 mM), glucosa (15 gL<sup>-1</sup>), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.75 gL<sup>-1</sup>) y extracto de levadura (0.75 gL<sup>-1</sup>) por otra parte la concentración baja de Cd<sup>2+</sup> y glucosa, pero la concentración alta de nitrato de amonio y extracto de levadura dio como resultado la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> más baja (2.16 mgL<sup>-1</sup>). La Figura 5-C contrasta la respuesta observada y la respuesta predicha, se utilizó la prueba de normalidad para construir una gráfica de probabilidad normal, la cual resulta en una línea recta (Fig. 5-D). El coeficiente de correlación de Pearson fue alto (0.89) lo cual indica una fuerte relación entre las respuestas observadas y predichas.

## Biomasa

El modelo para la producción de biomasa (Ecuación 3) fue significativo ( $p = 0.004$  y  $R^2 = 0.88$ ), los factores que muestran efectos positivos (Tabla 14) con un nivel de confianza del 95% son  $Cd^{2+}$  ( $p = 0.0009$ ) y glucosa ( $p = 0.0003$ ). Del mismo modo, las interacciones de  $Cd^{2+} * Glucosa$  ( $p = 0.02$ ) y  $Cd^{2+} * Levadura$  ( $p = 0.005$ ) fueron significativas.

$$Y_{3biomasa} = 2.59 - 0.82 * Cd + 0.96 * G + 0.074 * N - 0.28 * Y - 0.48 * Cd * G - 0.63 * Cd * Y \quad (3)$$

El coeficiente de correlación obtenido ( $R^2 = 0.8$ ) indica una fuerte relación entre los datos predichos para la solubilización de fosfato y los datos obtenidos experimentalmente. El gráfico de probabilidad normal de los residuales para evaluar la normalidad resultó en una línea recta (Figura 20-B). Además, los coeficientes negativos correspondientes a  $Cd^{2+}$  (-11.49) y extracto de levadura (-13.90) indicaron que solubilización de fosfato disminuyó con el aumento de la concentración de  $Cd^{2+}$  y la cantidad de extracto de levadura

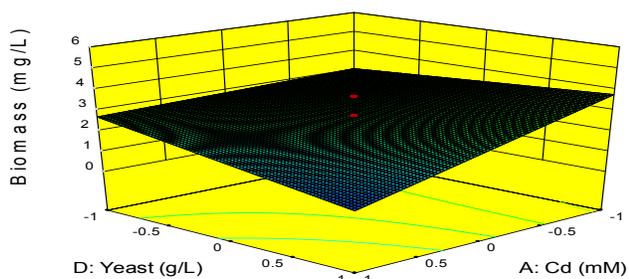
**Tabla 14.** Análisis ANOVA para la producción de biomasa por *P. italicum*

Efectos	Estimado	<i>p</i> value	SS	df	MS	F
Efectos principales						
Cd	-0.82	0.0009	10.66	1	10.66	22
G	0.96	0.0003	14.67	1	14.67	30.27
N	0.072	0.6858	0.084	1	0.084	0.17
Y	-0.28	0.1341	1.29	1	1.29	2.66
Interacción de Factores						
Cd × G	-0.48	0.02	3.74	1	3.74	7.73
Cd × N	-0.056	0.75	0.051	1	0.051	0.10
Cd × Y	-0.063	0.005	6.35	1	6.35	13.10
G × Y	-0.17	0.3620	0.44	1	0.44	0.91
Error			0.67	2	0.34	
Total SS			42.13	18		

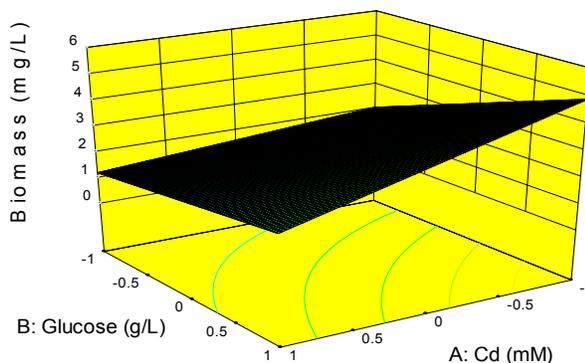
<sup>a</sup>SS = Suma de cuadrados; df = Grados de libertad; MS = Cuadrados medios;  $R^2 = 0.8850$ ; Coeficiente de variación (%) = 26.60; Cd =  $Cd^{2+}$ ; G = Glucosa; N = Nitrato de amonio; Y = Extracto de levadura. Los números en itálicas representan la respuesta de los factores que tienen un efecto significativo sobre la producción de biomasa por *P. italicum*.

El valor más alto de la biomasa se obtuvo en el experimento 9 ( $5.43 \text{ mgL}^{-1}$ ), cuya formulación consiste en una baja cantidad de  $\text{Cd}^{2+}$  y altos niveles de glucosa, nitrato de amonio y extracto de levadura, en contraste el nivel más bajo de biomasa se obtuvo en el experimento 8 cuya formulación consiste en altos valores de  $\text{Cd}^{2+}$  / extracto de levadura y bajas cantidades de glucosa y nitrato de amonio. El coeficiente negativo correspondiente a  $\text{Cd}^{2+}$  ( $-0.82$ ) en la ecuación 3 sugiere que la biomasa fúngica disminuye con el aumento de la concentración  $\text{Cd}^{2+}$  en el medio de cultivo. El extracto de levadura ( $-0.28$ ) mostró un efecto similar pero más débil para  $\text{Cd}^{2+}$  (Fig. 19A), por su parte la glucosa juega un papel importante en la producción de biomasa (Figura 19B) por lo que se observa un coeficiente positivo ( $0.96$ ) en la ecuación 3, la Figura 5-E muestra el contraste de las respuestas experimentales y predichos, y por último la Figura 5-F es una gráfica de probabilidad normal.

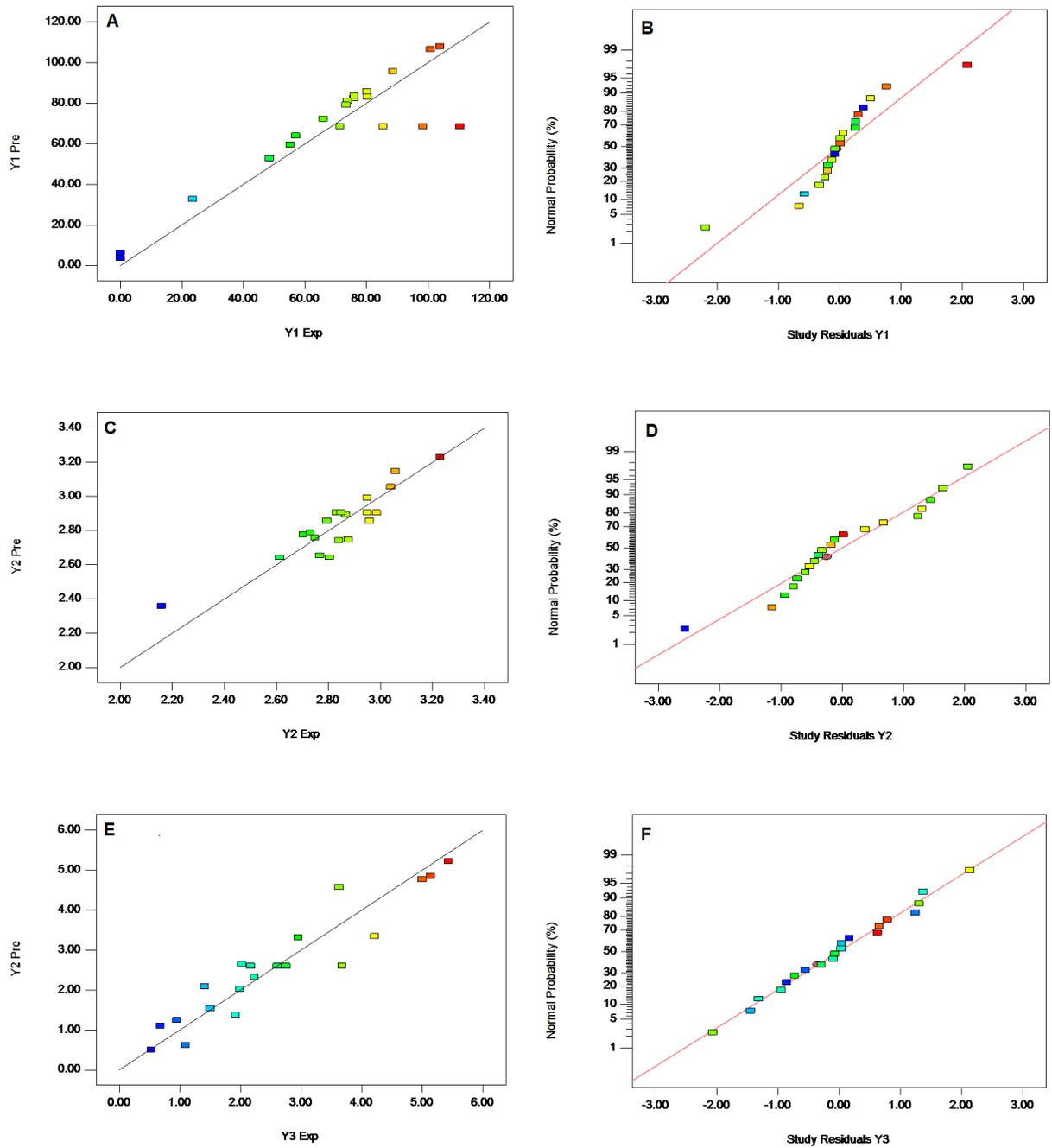
**A)**  
 Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 Biomass (mg/L)  
 ● Design points above predicted value  
 ● Design points below predicted value  
 5.43  
 0.53  
 X1 = A: Cd  
 X2 = D: Yeast  
 Actual Factors  
 B: Glucose = 0  
 C: Ammonium = 0



**B)**  
 Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 Biomass (mg/L)  
 5.43  
 0.53  
 X1 = A: Cd  
 X2 = B: Glucose  
 Actual Factors  
 C: Ammonium = 0  
 D: Yeast = 0.135135



**Figura 19.** Análisis gráfico de la interacción A)  $\text{Cd}^{2+}$  y levadura, B) Cadmio y Glucosa para la producción de biomasa obtenido a través de programa Design-Expert Software.



**Figura 20.** Análisis gráfico del modelo ajustado por  $Y1$  = Solubilization de Fosfato (A),  $Y2$  = Peróxido de hidrógeno (C), y  $Y3$  = Biomasa (E). Los análisis de regresión se establecieron entre la predicción y los valores experimentales. El análisis estadístico fue ajustado a una curva de normalidad de los residuales  $Y1$  (B),  $Y2$  (D), y  $Y3$  (F).

El decremento en la solubilización de fosfato se correlaciona con la reducción de biomasa fúngica debido al efecto tóxico del  $\text{Cd}^{2+}$  (Vig et al., 2003). Tuason y Arocena (2009) demostraron que la solubilización de fosfato correlaciona positivamente con la biomasa fúngica, la oxidación de la glucosa y otros productos intermediarios de la producción de ácidos orgánicos (Chaiharn y Lumyong, 2009), relacionado con la disminución del pH (Walpolá y Yoon, 2013), este fenómeno se ha relacionado directamente con la liberación del fósforo (Johnson y Loeppert, 2006; Onthong et al., 2007; Scervino et al., 2010), sin embargo, esto no parece aplicarse a todos los casos puesto que no existen informes de correlaciones positivas entre la cantidad de fósforo soluble y la producción de ácidos orgánicos, en este sentido Pradhan y Sukla, (2005) afirman que los fosfatos de calcio se disuelven a través de la acidificación del medio de cultivo, también reportan que el uso de glucosa y sulfato de amonio favorece una disminución en el pH. En este estudio se evaluó la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como un mecanismo de respuesta al estrés fisiológico debido a la concentración de  $\text{Cd}^{2+}$  en el medio de cultivo. Aunque fue posible determinar una correlación entre la solubilización de fosfato y la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , no se observó un efecto significativo del  $\text{Cd}^{2+}$  sobre la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , es probable que otras respuestas fisiológicas esten involucradas en el estrés inducido por  $\text{Cd}^{2+}$ , como pudiera ser la actividad enzimática, la producción de ácidos orgánicos u otros tipos de ROS. Hay informes (Hammel et al., 2000; Tanaka et al., 2006), relativos a la producción de ROS en varias especies de hongos; sin embargo, su papel en el metabolismo de hongos permanece muy poco claro (Bai et al., 2003).

El extracto de levadura afectó negativamente la solubilización, el extracto de levadura es una fuente de nitrógeno pero más compleja que otras fuentes como el caso del sulfato de amonio (Nahas, 2007). El aumento de  $\text{Cd}^{2+}$  en medio Pikowskaya afecta negativamente la solubilización de fosfato, sin embargo altas concentraciones de glucosa reducen el efecto del  $\text{Cd}^{2+}$ . Además de la influencia de los factores nutricionales (Fomina et al., 2003), la influencia de factores abióticos tales como el pH, la temperatura y el oxígeno disponible pueden afectar la habilidad de solubilización. Los efectos de estos factores y sus interacciones con los metales pesados también ser considerados para evaluar la habilidad de solubilización de fosfato realizada por hongos.

### 7.2.8 Efecto de la suplementación de nutrientes sobre la solubilización de fosfato

Con base en los resultados previos se decidió implementar un diseño experimental más robusto que incluirá cuatro cepas, dos de cada género (*P. italicum* – *P. dipodomyicola* / *A. japonicus* – *A. niger*), dos fuentes de fosfato (Ca-P / Fe-P), adición de cadmio y evaluación de los factores nutricionales como se describe en la sección 6.6.6. Los 20 matraces se mantuvieron durante cinco días, este tiempo se ajustó así, debido a la detección de la mayor actividad de fosfatasa ácida en ese tiempo.

Las cantidades de  $Cd^{2+}$  se añadieron considerando al  $CE_{50}$  obtenida en los ensayos dosis – respuesta. En agar Pikovskaya usando Ca-P (Tabla 15A) se registraron los crecimientos de las cepas evaluadas ( $F = 542.31$ ;  $p = 0.0000$ ); *A. japonicus* ( $0.7771 \text{ cm}^{-1} \text{ día}$ ) y *A. niger* ( $0.7195 \text{ cm}^{-1} \text{ día}$ ) lograron el mayor DCD comparado con *P. italicum* ( $0.4706 \text{ cm día}^{-1}$ ) y *P. dipodomyicola* ( $0.4091 \text{ cm día}^{-1}$ ). La cepa de *A. japonicus* logró el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial más bajo (38.77%) y el IT más alto (0.6120) a la concentración más alta de  $Cd^{2+}$  (0.62 mM), en este medio fue posible detectar el halo de solubilización de fosfato, *P. italicum* obtuvo la tasa más alta de solubilización en el control (1.97) sin adición de  $Cd^{2+}$ ; *P. dipodomyicola* mostró los valores más altos de ISF, sin embargo *A. niger* presentó el más alto ISF (3.56) a la concentración de 0.62 mM.

En el caso de tratamientos con Fe-P (Tabla 15B) se realizó el mismo procedimiento para registrar el crecimiento de las cepas ( $F = 183.24$ ,  $p = 0.0000$ ), en este caso *A. niger* ( $0.7443 \text{ cm}^{-1} \text{ día}$ ) obtuvo el DCD más grande comparado con las cepas de *A. japonicus* ( $0.44 \text{ cm}^{-1} \text{ día}$ ), *P. italicum* ( $0.5063 \text{ cm día}^{-1}$ ) y *P. dipodomyicola* ( $0.2282 \text{ cm día}^{-1}$ ) esta última cepa mostró el ICM más bajo (51.02%) y el IT más alta (0.4897) en la concentración mayor de  $Cd^{2+}$  (0.62 mM) no se observaron diferencias significativas entre estos tratamientos para cada concentración, la presencia de halos no se detecto en la placas de Fe-P.

Tabla 15A. Crecimiento de cuatro cepas evaluadas bajo estrés por Cd<sup>2+</sup> en medio Pikowskaya con Ca-P

Cepa	Concentración (mM)	DCD (mm día <sup>-1</sup> )	ICM (%)	IT	ISF
<i>Penicillium italicum</i>	Control	0.4706 ± 0.0077 a			1.9784 ± 0.0929 a
	0.075	0.4759 ± 0.0156 a	17.4753 ± 1.7238 a	0.8252 ± 0.0172 a	1.8007 ± 0.3074 a
	0.15	0.4156 ± 0.0514 a	28.4001 ± 6.4528 b	0.7160 ± 0.0645 b	1.9954 ± 0.7970 ab
	0.31	0.2344 ± 0.0258 b	51.9429 ± 4.3938 c	0.4281 ± 0.0371 c	2.0605 ± 0.3908 ab
	0.62	0.1500 ± 0.0368 c	67.4395 ± 2.2997 d	0.2599 ± 0.0274 d	2.5573 ± 0.2582 b
<i>Penicillium dipodomyicola</i>	Control	0.4091 ± 0.0276 a			1.9384 ± 0.1349 a
	0.075	0.2813 ± 0.0125 b	23.7773 ± 0.7909 a	0.7622 ± 0.0079 a	2.9047 ± 0.2945 b
	0.15	0.3031 ± 0.0188 b	29.4142 ± 1.7992 a	0.7059 ± 0.0180 a	2.8130 ± 0.3273 b
	0.31	0.2719 ± 0.0120 b	39.6962 ± 3.1363 b	0.6030 ± 0.0314 b	2.7594 ± 0.5005 b
	0.62	0.2125 ± 0.0144 c	62.9600 ± 4.1667 c	0.3704 ± 0.0417 c	3.3542 ± 0.3170 b
<i>Aspergillus japonicus</i>	Control	0.7772 ± 0.0062 a			0.8477 ± 0.0031 a
	0.075	0.6946 ± 0.0056 b	6.4396 ± 0.2989 a	0.9356 ± 0.0030 a	1.0385 ± 0.0219 b
	0.15	0.6908 ± 0.0075 b	11.1448 ± 0.5810 b	0.8886 ± 0.0058 b	1.0986 ± 0.0171 b
	0.31	0.4988 ± 0.0091 c	23.3119 ± 0.3273 c	0.7669 ± 0.0033 c	1.7086 ± 0.0278 c
	0.62	0.3875 ± 0.0010 d	38.7979 ± 0.7237 d	0.6120 ± 0.0072 d	2.1339 ± 0.0688 d
<i>Aspergillus niger</i>	Control	0.7195 ± 0.0106 b			1.4776 ± 0.0370 a
	0.075	1.1610 ± 0.0193 a	17.2357 ± 1.7324 a	0.8276 ± 0.0173 a	1.36 ± 0.037 a
	0.15	1.1215 ± 0.0706 a	37.0844 ± 5.1527 b	0.6292 ± 0.0515 b	1.5537 ± 0.2506 a
	0.31	0.3400 ± 0.0082 c	48.2525 ± 0.8341 c	0.5175 ± 0.0083 c	3.3356 ± 0.4023 b
	0.62	0.1793 ± 0.0009 d	67.8097 ± 2.4206 d	0.3219 ± 0.0242 d	3.5643 ± 0.2642 b

Medias (n = 4) con la misma letra no son significativamente entre si (DMS test,  $\alpha = 0.05$ ). DCD = Diámetro de crecimiento diario, IVM= Inhibición del crecimiento micelial, IT = índice de tolerancia, ISF = Índice de solubilización de fosfato

Tabla 15B. Crecimiento de cuatro cepas evaluadas bajo estrés por Cd<sup>2+</sup> en medio Pikowskaya con Fe-P

Cepa	Concentración (mM)	DCD (mm día <sup>-1</sup> )	ICM (%)	IT
<i>Penicillium italicum</i>	Control	0.5063 ± 0.0312 <b>a</b>		
	0.075	0.3978 ± 0.0188 <b>b</b>	34.0319 ± 1.6879 <b>a</b>	0.6597 ± 0.0169 <b>a</b>
	0.15	0.3541 ± 0.0083 <b>c</b>	50.5326 ± 1.1518 <b>b</b>	0.4947 ± 0.0115 <b>b</b>
	0.31	0.2816 ± 0.0080 <b>d</b>	55.7442 ± 0.6009 <b>c</b>	0.3818 ± 0.0094 <b>c</b>
	0.62	0.1134 ± 0.0054 <b>e</b>	72.0897 ± 1.0671 <b>d</b>	0.2020 ± 0.0017 <b>d</b>
<i>Penicillium dipodomyicola</i>	Control	0.2281 ± 0.0030 <b>a</b>		
	0.075	0.2325 ± 0.0084 <b>a</b>	27.2213 ± 1.9487 <b>a</b>	0.7278 ± 0.0195 <b>a</b>
	0.15	0.2159 ± 0.0145 <b>bc</b>	36.5856 ± 1.5144 <b>b</b>	0.6341 ± 0.0151 <b>b</b>
	0.31	0.1991 ± 0.0093 <b>c</b>	39.6313 ± 1.2745 <b>c</b>	0.6037 ± 0.0127 <b>c</b>
	0.62	0.1463 ± 0.0070 <b>d</b>	51.0256 ± 0.6759 <b>d</b>	0.4897 ± 0.0068 <b>d</b>
<i>Aspergillus japonicus</i>	Control	0.4400 ± 0.0382 <b>a</b>		
	0.075	0.4266 ± 0.0036 <b>a</b>	10.7821 ± 1.2854 <b>a</b>	0.8922 ± 0.0129 <b>a</b>
	0.15	0.4428 ± 0.0057 <b>a</b>	39.6769 ± 2.5493 <b>b</b>	0.6032 ± 0.0255 <b>b</b>
	0.31	0.3497 ± 0.0103 <b>b</b>	62.7209 ± 1.5084 <b>c</b>	0.3728 ± 0.0151 <b>c</b>
	0.62	0.1016 ± 0.0054 <b>c</b>	84.0220 ± 0.2710 <b>d</b>	0.1598 ± 0.0027 <b>d</b>
<i>Aspergillus niger</i>	Control	0.7444 ± 0.0388 <b>a</b>		
	0.075	0.7369 ± 0.0171 <b>ab</b>	8.7986 ± 0.9470 <b>a</b>	1.1942 ± 0.0115 <b>a</b>
	0.15	0.6806 ± 0.0101 <b>b</b>	17.9264 ± 1.0620 <b>b</b>	1.0786 ± 0.0139 <b>b</b>
	0.31	0.5225 ± 0.6346 <b>c</b>	56.5473 ± 2.3375 <b>c</b>	0.6620 ± 0.0306 <b>c</b>
	0.62	0.3806 ± 0.0163 <b>d</b>	67.2953 ± 0.9525 <b>d</b>	0.4370 ± 0.0136 <b>d</b>

Medias (n = 4) con la misma letra no son significativamente entre si (DMS test,  $\alpha = 0.05$ ). DCD = Diámetro de crecimiento diario, IVM= Inhibición del crecimiento micelial, IT = índice de tolerancia, ISF = Índice de solubilización de fosfato

En cuanto a los efectos toxicológicos del Cd<sup>2+</sup> ejercidos sobre el crecimiento de los hongos y su morfología, según el análisis Probit en el medio Pikovskaya usando Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> el hongo más susceptible a Cd<sup>2+</sup> fue *A. japonicus* con una CE<sub>50</sub> de 0.26 mM; mientras que las cepas más tolerantes fueron *P. dipodomyicola* y *A. niger* que presentaron valores de 0.35 y 0.46 mM, respectivamente (Tabla 16). Mientras que el medio Pikovskaya con FePO<sub>4</sub>, *P. italicum* fue la cepa más susceptibles con una CE<sub>50</sub> de 0.18 mM, mientras que la cepa más tolerante resultó *P. dipodomyicola* con una CE<sub>50</sub> de 0.62 mM (Tabla 16).

Tabla 16. Concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) obtenida a través de un ensayo dosis respuesta con Ca-P y Fe-P inoculados con cepas fúngicas aisladas de la rizósfera de *P. australis*

Cepa	Tipo de Fosfato	CE <sub>50</sub> (mM)	Intervalos de confianza (mM)	Ecuación Probit	χ <sup>2</sup>	Pr > χ <sup>2</sup>
<i>P. italicum</i>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0.32	0.29 – 0.34 b	y = 2.02 + 1.015 x	345.57	< 0.0001
<i>P. dipodomyicola</i>		0.46	0.36 – 0.51 a	y = 0.4323 + 1.1691 x	137.9	< 0.0001
<i>A. japonicus</i>		0.26	0.25 – 0.27 c	y = 2.54 + 4.44 x	628.84	< 0.0001
<i>A. níger</i>		0.35	0.32 – 0.40 ab	y = 1.676x + 0.7470 x	266.15	< 0.0001
<i>P italicum</i>	FePO <sub>4</sub>	0.18	0.15 – 0.21 d	y = 0.0715 + 1.0104 x	113.24	< 0.0001
<i>P. dipodomyicola</i>		0.62	0.46 – 1.02 a	y = 0.1316 + 0.6426 x	46.44	< 0.0001
<i>A. japonicus</i>		0.26	0.25 – 0.27 c	y = 2.54 + 4.44 x	628.84	< 0.0001
<i>A. níger</i>		0.35	0.32 – 0.38 b	y = 2.07x + 0.9414 x	353.96	< 0.0001

De acuerdo con la superposición de la Intervalos de confianza, medias con la misma letra no son significativamente diferentes uno del otro (α = 0.05). CE<sub>50</sub> = Concentración efectiva media

### *Diseño experimental*

Los resultados obtenidos para cada uno de los 20 experimentos se utilizaron para obtener modelos matemáticos para cada cepa fúngica en cada tipo de fosfato evaluado. La concentración inicial de fósforo introducida en forma de sales de fosfato fue 99.88 mgL<sup>-1</sup> (Ca-P) y 65.45 mgL<sup>-1</sup> (Fe-P), estos valores fueron calculados de acuerdo al peso molecular de cada compuesto, después de cinco días de incubación. Se evaluó la eficiencia de solubilización de fosfato mostrada en la Tabla 17 como porcentaje de fósforo soluble, en la parte inferior de la tabla se incluye el porcentaje de fósforo soluble en ausencia de Cd<sup>2+</sup>. La cepa con el mayor porcentaje de solubilización a cinco días resultó *P. italicum* mientras que *A. japonicus* mostró la menor eficiencia de solubilización; los tratamientos con Ca-P obtuvieron mayores eficiencias de solubilización comparados con los tratamientos con Fe-P.

El efecto de los factores evaluados en la solubilización de fosfato se determinó a partir de un análisis ANOVA, en la tabla 18 se muestran los modelos obtenidos para cada cepa, para las cepas de *Penicillium* ninguno de los factores evaluados difieren significativamente en los tratamientos con Ca-P, sin embargo en los tratamientos con P-Fe, el factor más significativo para *P. italicum* fue el Cd<sup>2+</sup> (F: 25.66, p: 0.0007); mientras que para *P. dipodomyicola* los factores más significativos fueron la glucosa (F: 18.42, p: 0.002), sulfato de amonio (F: 14.57, p: 0.004) y la interacción entre estos factores (F: 14.57, p: 0.0041). Por otra parte, en el caso de especies de *Aspergillus* se observó un mayor efecto de los factores evaluados; en el caso de *A. japonicus* el factor de mayor importancia que resultó ser el Cd<sup>2+</sup> para ambos tratamientos para P-Ca (F: 12.25; p= 0.0067) y P-Fe (F: 16.42; p= 0.0029), mientras tanto para *A. niger* el extracto de levadura resultó ser el factor de mayor impacto (F: 5.62; p= 0.0419) en los tratamientos de P-Ca, para los tratamientos con P-Fe solamente la interacción Cd<sup>2+</sup>/glucosa (F: 9.23; p= 0.0141) fue el factor más significativo.

**Tabla 17.** Eficiencia de solubilización (%) obtenido despues de cinco días de incubación

Tratamiento	<i>P. italicum</i>		<i>P. dipodomycicola</i>		<i>A. japonicus</i>		<i>A. niger</i>	
	P-Ca	P-Fe	P-Ca	P-Fe	P-Ca	P-Fe	P-Ca	P-Fe
1	19.001	3.095	13.639	0.000	5.681	3.508	1.091	9.553
2	19.563	3.690	13.746	0.000	5.316	3.418	1.338	7.949
3	18.384	4.483	12.245	0.000	6.699	3.066	1.005	6.247
4	17.956	3.783	14.738	0.000	5.541	3.591	0.984	7.687
5	17.232	0.596	13.773	0.000	7.943	2.756	0.770	6.705
6	15.864	1.076	18.571	0.000	7.461	0.310	0.866	10.158
7	21.601	4.119	18.116	0.937	4.469	1.108	0.823	9.716
8	18.250	0.683	10.314	0.000	7.311	0.000	0.834	7.916
9	18.411	1.202	13.076	0.322	5.477	3.835	0.737	10.158
10	14.202	4.364	15.810	0.000	7.568	9.503	2.861	8.342
11	15.462	0.698	19.108	0.000	7.611	1.235	1.863	10.060
12	10.556	3.742	6.052	0.000	5.927	3.549	2.785	7.180
13	13.988	4.373	8.572	0.000	6.978	3.844	2.389	8.096
14	16.320	0.442	22.914	0.457	7.933	4.506	1.928	4.611
15	8.652	0.359	12.326	0.015	7.632	0.000	2.571	8.456
16	18.036	4.634	12.272	2.000	9.874	2.581	2.324	7.098
17	21.280	4.487	17.205	0.759	6.689	1.830	0.802	8.735
18	16.749	3.551	10.368	0.000	5.799	3.639	2.217	9.291
19	20.422	4.107	20.341	2.115	6.753	3.598	2.861	7.867
20	16.267	0.367	15.837	0.000	7.161	0.000	1.949	5.429
Control	38.006	3.178	37.465	1.536	35.302	0.678	37.485	0.521

**Tabla 18** Modelos obtenidos para el fósforo soluble después de cinco días de incubación.

Cepa	Tipo de Fosfato	Modelo	F	P - Value	R <sup>2</sup>	C.V. %
<i>P. italicum</i>	P-Ca	16.89 + 1.36A - 1.49B - 0.92C + 0.39D - 0.03AB + 0.08AC + 1.04AD - 0.44BC + 0.36BD - 0.67CD	1.10	0.4498	0.54	18.81
	P-Fe	1.76 + 0.90A + 0.049B - 0.30C - 0.28D + 0.33AB + 0.022AC + 0.10AD + 0.31BC + 0.24BD + 0.057CD	3.97	0.0250	0.81	40.27
<i>P. dipodomycicola</i>	P-Ca	14.43 - 0.37A - 0.56B - 1.27C - 0.87D + 0.1AC + 0.54AD + 1.31BC - 0.55BD - 1.73CD	0.61	0.7756	0.40	32.19
	P-Fe	0.19 + 0.037A - 0.24B - 0.21C - 0.098D - 0.037AB - 0.011AC + 0.028AD + 0.21 BC + 0.098BD + 0.12CD	6.00	0.0063	0.8696	116.51
<i>A. japonicus</i>	P-Ca	6.78 - 0.81A + 0.27B - 0.23C - 0.28D + 0.47AB + 0.25AC - 0.13AD + 0.24BC + 0.20BD + 0.24CD	2.46	0.0961	0.7318	13.66
	P-Fe	1.83 + 0.77A + 0.14B - 0.054C - 0.30D + 0.37AB + 0.83AC - 0.56AD + 0.32BC - 0.29BD - 0.22CD	5.74	0.0074	0.8645	41.55
<i>A. niger</i>	P-Ca	1.65 - 0.018A + 0.021B - 0.100C - 0.44D + 0.14AB - 0.017AB - 0.32AD + 0.28BC + 0.082BD + 0.20CD	1.34	0.3337	0.5989	44.62
	P-Fe	5.28 + 0.27A + 0.25B + 0.072C - 0.10D - 0.60AB - 0.21AC + 0.31AD - 0.10BC - 0.43BD + 0.17CD	2.28	0.1157	0.7167	14.90

Variables: A. Cadmio, B. Glucosa, C. Sulfato de amonio, D. Extracto de levadura

El efecto toxicológico ejercido por la presencia del metal se refleja directamente en el crecimiento fúngico y también sobre la fisiología y el metabolismo, por ejemplo, se ha demostrado que la capacidad de solubilización de fosfato se mantiene incluso en la presencia de Cd<sup>2+</sup>. Por otra parte Kozlova *et al.*, (2010) reportaron que los iones Ca<sup>2+</sup> promueven la esporulación y el crecimiento micelial, por lo que existe la hipótesis de que las cepas que crecen en medio Pikowskaya con calcio pueden presentar un mayor crecimiento en comparación con aquellos en los que se suplementó el medio con hierro. La capacidad para solubilizar fosfatos puede estar relacionado con el grado de solubilidad de los compuestos, mientras que el Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> tiene mayor solubilidad (2.21 × 10<sup>-4</sup> gL<sup>-1</sup>) en comparación con el FePO<sub>4</sub> (1.78 × 10<sup>-9</sup> gL<sup>-1</sup>). Por lo que los compuestos de

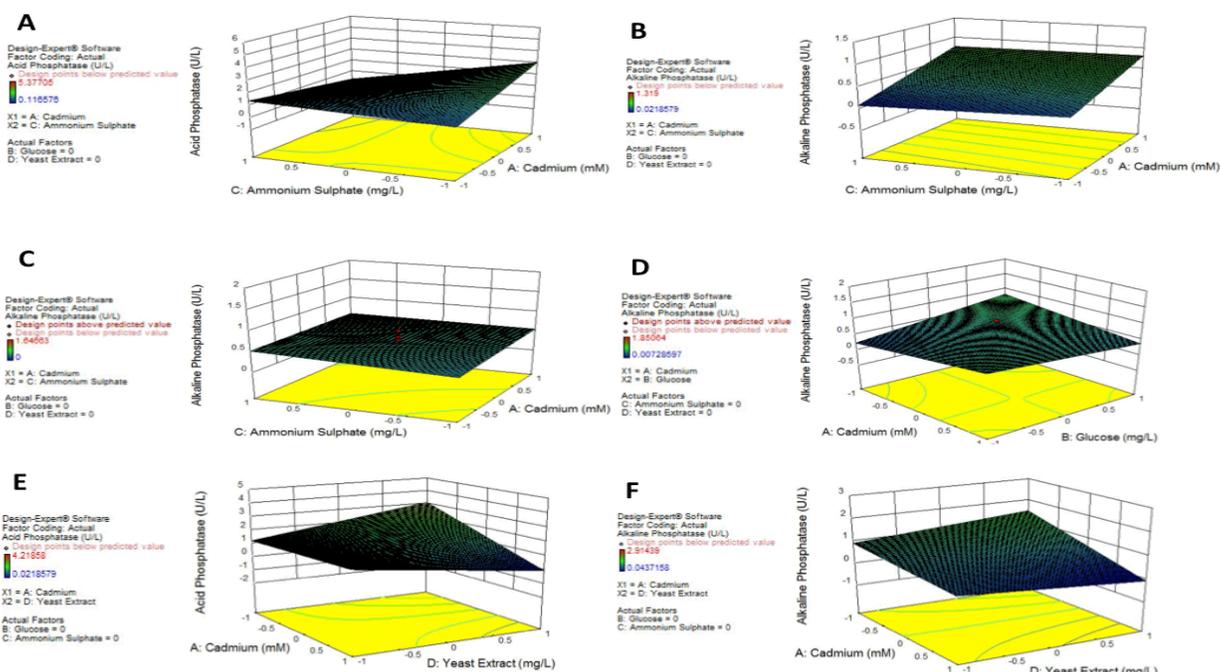
calcio son más fácilmente solubilizados (Nahas y Barroso, 2005), por otro lado es probable que la cantidad de fosfato solubilizado en los tratamientos con fosfato de hierro pudiera ser utilizado en el metabolismo fúngico (Hernández - Leal *et al.*, 2011).

#### *Ácidos Orgánicos y Fosfatasa*

Estas variables de respuesta están directamente relacionadas con la solubilización de fosfato, tres ácidos orgánicos (ácido oxálico, cítrico, glucónico) fueron evaluados, inicialmente no fue posible determinar diferencias significativas entre los tratamientos de acuerdo con la producción de ácidos orgánicos por parte de las cepas fúngicas no obstante, los efectos principales en *A. niger* se observaron en el tratamiento de Ca-P donde el factor de la mayor importancia es el  $Cd^{2+}$  (F: 5.62; p= 0.0419) para el ácido cítrico, mientras que el ácido glucónico el factor significativo es la interacción entre el las fuentes de nitrógeno, sulfato de amonio y extracto de levadura (F: 6.66; p= 0.0297); para *P. italicum* en el tratamiento con Fe-P se observó un efecto significativo del extracto de levadura sobre la producción de ácido glucónico (F: 6.22; p= 0.0342); para el caso del ácido oxálico se determinaron diferencias significativas en el tratamiento con Ca-P para *P. dipodomyicola* donde la interacción entre  $Cd^{2+}$  y sulfato de amonio fue el efecto con mayor significatividad (F: 7.37; p= 0.0238).

En cuanto a los factores de mayor impacto sobre la actividad enzimática de la fosfatasa (Figura 21), se observó un efecto significativo para los tratamientos de Ca-P con *P. italicum*, el efecto de mayor importancia es la interacción sulfato de amonio /  $Cd^{2+}$  ( F: 7.09; p= 0.0259) para la fosfatasa ácida, en el caso de la fosfatasa alcalina el  $Cd^{2+}$  (F: 14.29; p= 0,0043) fue el factor de mayor significatividad; en el caso de *A. japonicus* se observaron las mismas tendencias en los tratamientos con P-Ca para ambas actividades enzimáticas, en el caso de la fosfatasa ácida la interacción  $Cd^{2+}$  - extracto de levadura (F: 6.81; p= 0.0283) es el factor de mayor significatividad mientras que en el caso de la fosfatasa alcalina, el  $Cd^{2+}$  (F: 7.29; p= 0,0244) es el factor de mayor significatividad, no obstante, en los tratamientos de *A. japonicus* con P-Fe, el  $Cd^{2+}$  (F: 5.72; p= 0,0405) resulta ser el factor de mayor significatividad sobre la actividad de la fosfatasa ácida; para el caso de *P. dipodomyicola* con P-Ca hay un efecto significativo de la interacción de glucosa-

sulfato de amonio (F: 5.99; p= 0.0401) sobre la actividad fosfatasa alcalina y para la misma cepa pero con tratamiento P-Fe el factor de mayor significatividad resulta ser la interacción Cd<sup>2+</sup> - Glucosa (F: 5.85; p= 0.0387), el efecto significativo del Cd<sup>2+</sup> (F: 11.87; p= 0.0073) sobre la actividad de la fosfatasa alcalina también se observó en el tratamiento de *A. niger* con P-Ca.



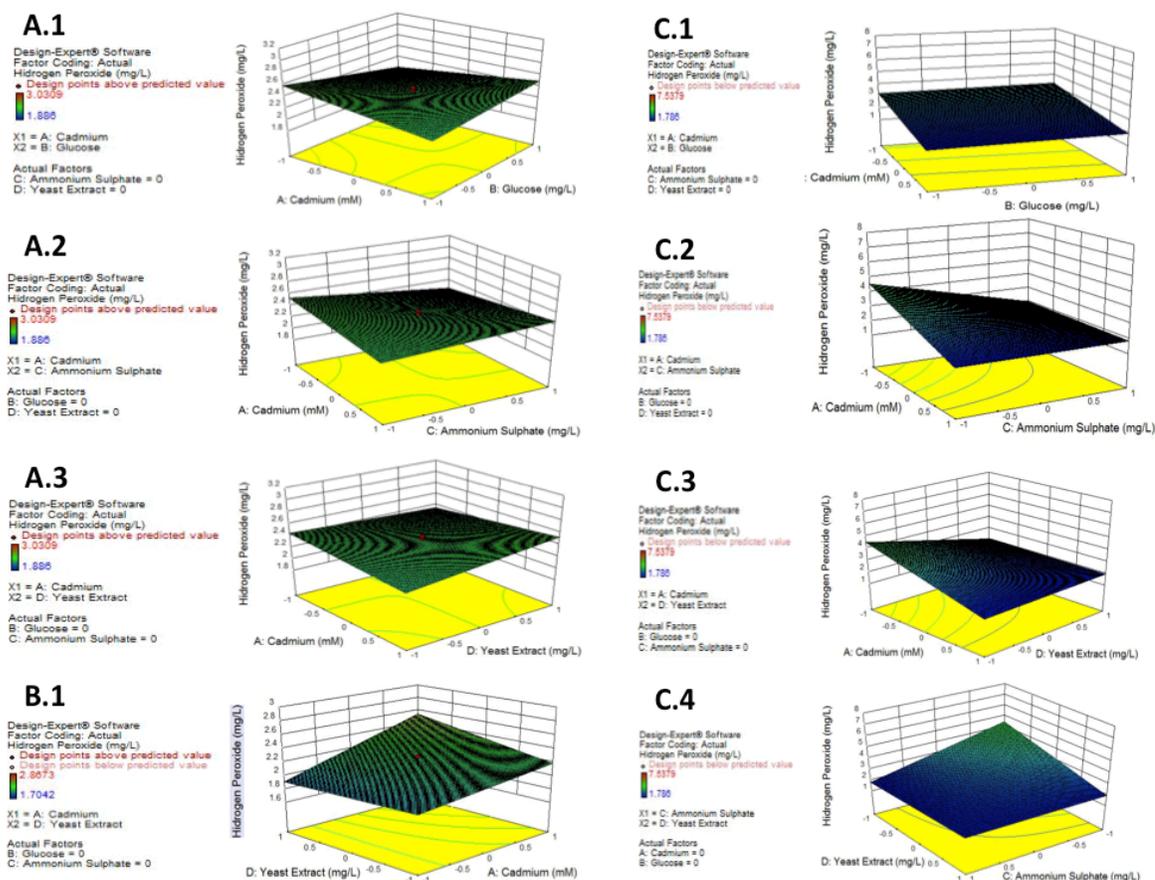
**Figura 21.** Efecto de varios factores evaluados sobre la actividad de la fosfatasa **A.** Fosfatasa ácida, *P. italicum* – P-Ca **B.** Fosfatasa álcaina, *P. italicum* – P-Ca **C.** Fosfatasa álcaina, *P. dipodomyicola* – P-Ca **D.** Fosfatasa álcaina, *P. dipodomyicola* – P-Fe **E.** Fosfatasa ácida, *A. japonicus* – P-Ca **F.** Fosfatasa álcaina, *A. japonicus* – P-Ca.

La producción de ácidos orgánicos tales como oxálico, cítrico, glucónico y succínico ha sido reportada para hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Maliha *et al.*, 2004), la generación de ácidos orgánicos no debe ser considerado como un mecanismo de tolerancia respuesta a la presencia de metales (Meharg, 2003), en nuestro estudio determinamos que la generación de ácidos orgánicos permitió una disminución en el pH del medio que favorece la solubilización de fosfato. Sin embargo, la presencia de cadmio podría interactuar con los ácidos orgánicos generados por el hongo (Fomina *et al.*, 2005); Budford *et al.*, (2003) se han centrado en la disolución y transformación de minerales

que contienen calcio (por ejemplo, fosfatos de calcio) a través de ácidos orgánicos, las propiedades metal-complejantes de los ácidos orgánicos facilitan la biodisponibilidad de elementos, determinan la especiación de metales y su movilidad en el medio ambiente (Gadd, 2000; Gadd, 2004). La producción de ácidos orgánicos y fosfatasa incrementa la solubilización de fosfato mediante la liberación de fosfatos orgánicos y su mineralización mediante el aumento de la tasa de escisión hidrolítica (George *et al.*, 2002); de acuerdo con el estudio de Renella *et al.*, (2003) ambas fosfatasa están indirectamente relacionados con la disminución de la toxicidad de metales a través de la precipitación de los iones en forma de fosfatos lo cual impide la captación celular; la reducción de la biomasa fúngica se observa por efecto de la limitación de glucosa y fuentes de nitrógeno, además de la suplementación de  $Cd^{2+}$  como lo reporta Landi *et al.*, (2000).

#### *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, biomasa, proteína y pH*

En los tratamientos de *Aspergillus* se observó un efecto mayor de los factores evaluados en la generación de peróxido de hidrógeno, especialmente en el caso de tratamientos de *A. niger* con Ca-P y Fe-P (Figura 22); en los tratamientos de Ca-P el efecto de  $Cd^{2+}$  (F: 7.69; p= 0.0217), sulfato de amonio (F: 6.59; p= 0.0314), extracto de levadura (F: 5.28; p= 0.0472) y la interacción entre los factores,  $Cd^{2+}$ / sulfato de amonio (F: 6.38; p= 0.0324),  $Cd^{2+}$ /extracto de levadura (F: 7.22; p= 0.0249) y sulfato de amonio / extracto de levadura (F: 7.17; p= 0.0253), en el caso de los tratamientos con Fe-P se determinó que los efectos significativos son  $Cd^{2+}$  (F: 26.58; p= 0.0006), sulfato de amonio (F: 11.75; p= 0.0075) y la interacción entre  $Cd^{2+}$ /extracto de levadura (F: 6.57; p= 0.0365). Para *A. japonicus* las interacciones entre  $Cd^{2+}$  y los otros factores evaluados glucosa (F: 15.96; p= 0.0031), sulfato de amonio (F: 7.86; p= 0.0206) y extracto de levadura (F: 6.15; p= 0.0350), así como la interacción entre sulfato de amonio/extracto de levadura (F: 9.57; p= 0.0129) tuvieron un efecto significativo sobre la producción de  $H_2O_2$ . En el caso de las cepas de *Penicillium* solamente se determinó el efecto significativo de la glucosa (F: 17.62; p= 0.0023) en el tratamiento de Fe-P para *P. dipodomyicola*.



**Figura 22.** Efectos significativos de los factores evaluados en la producción de peróxido de hidrógeno **A.** *Aspergillus japonicus* P-Fe **B.** *Aspergillus niger* P- Fe **C.** *Aspergillus niger* – P-Ca

En el caso de la biomasa, la adición de  $Cd^{+2}$  presentó un efecto significativo en los tratamientos, por ejemplo *P. italicum* con Ca-P (F: 6.33;  $p= 0.033$ ) y Fe-P (F: 36.54;  $p= 0.0002$ ), *A. japonicus* con Ca-P (F: 7.72;  $p= 0.0214$ ) y Fe-P (F: 10.92;  $p= 0.0092$ ), y para *A. niger* con Ca-P (F: 13,68;  $p= 0,0049$ ), para el tratamiento de *P. dipodomycicola* con Ca-P la interacción sulfato de amonio/ $Cd^{2+}$  (F: 6.02;  $p= 0.0439$ ) presentó un efecto significativo. Otro factor de influencia fue la glucosa para *A. japonicus* con Ca-P (F: 6.25;  $p= 0.0338$ ) y *P. italicum* con Ca-P (F: 9.55;  $p= 0.0129$ ), para esta misma cepa la interacción glucosa/extracto de levadura (F: 6.68;  $p= 0.0295$ ) también presentó un efecto significativo en Ca-P.

Para el caso de proteína total, el factor  $Cd^{2+}$  presentó un efecto significativo en los tratamientos, *P. italicum* con Fe-P (F: 23.9; p= 0.0009) y para *A. japonicus* Fe-P (F: 13.55; p= 0.0051 ), en el caso de esta cepa el extracto de levadura (F: 11.42; p= 0.0081) tuvo un efecto significativo, para *P. italicum* los factores más influyentes son glucosa (F: 9.55; p= 0.0129) y la interacción entre el extracto de levadura/ glucosa ( F: 6.68; p= 0.0295). En los tratamientos con Fe-P, un efecto significativo del  $Cd^{2+}$  sobre el pH, para cepas como *P. dipodomyicola* (F: 6.43; p= 0.0319), *A. japonicus* (F: 9.15, p: 0.0114) y *A. niger* (F: 6.43; p= 0.0319), en el caso de los tratamientos con Ca-P, el sulfato de amonio tuvo un efecto mayor sobre el pH, pero sólo en el caso de *P. dipodomyicola* (F: 77.31; p <0.0001) y *A. niger* (F: 77.3; p <0.0001).

Los factores nutricionales en el medio de cultivo tienen gran influencia sobre el crecimiento de los hongos, la habilidad de solubilización de fosfato e inclusive sobre la producción de metabolitos involucrados en el proceso. La solubilización de fosfato esta directamente relacionada con la disminución del pH, la generación de ácidos orgánicos es resultado del metabolismo de la fuente de carbono (Chung *et al.*, 2005; Vassilev *et al.*, 2006; Gulati *et al.*, 2010), en el caso de la glucosa, es una fuente de carbono de fácil. La capacidad de solubilización también depende de la naturaleza de la fuente de nitrógeno utilizada en el medio de cultivo; se han reportado mayores tasas de solubilización de fosfato en medio líquido cuando se adicionan sales de amonio a diferencia de cuando se utiliza nitrato como fuente de nitrógeno, esto se ha atribuido a la extrusión de protones que producen una acidificación mayor del pH extracelular (Scervino *et al.*, 2010). El metabolismo de amonio por parte de los hongos conduce a una rápida caída en el pH del medio, se cree que la excreción de protones que acompaña a la asimilación del ion amonio puede ser la explicación más probable para la solubilización microbiana sin producción de ácido orgánico (Park *et al.*, 2009). Además, la toxicidad de los metales en los hongos puede resultar en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en este caso la producción de  $H_2O_2$  se considera como un mecanismo de respuesta al estrés fisiológico por la concentración de  $Cd^{2+}$  en el medio de cultivo (Hammel *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2006).

## 7.3 Experimentos Hidropónicos

### 7.3.1 Fitotoxicidad de metales

A través de una inspección visual, se evaluó el efecto toxicológico ejercido por los metales evaluados sobre el crecimiento y desarrollo de *P. australis* (Figura 23), los demás parámetros se evaluaron a través de las metodologías descritas en la sección 6.7.2



Figura 23. Efecto fitotóxico ejercido por el cadmio y el plomo sobre plantas juveniles de *P. australis* a cinco diferentes concentraciones de metal desde 2.5 y hasta 25 ppm .

#### Parámetros Agronómicos

A través de la medición de parámetros agronómicos (altura/longitud radical) se determinó un análisis Probit para cada parámetro (Tabla 19); de acuerdo a los resultados obtenidos se observó que el metal de mayor fitotoxicidad resulta ser el cadmio al obtener los valores menores de CE<sub>50</sub>.

**Tabla 19** Análisis Probit para altura y longitud radical de *P. australis* creciendo en una agua sintética suplementada con metales Cd y Pb

Altura planta con Cd

Tiempo de Exposición	CE <sub>50</sub> mgL <sup>-1</sup>	Intervalo de confianza	Pendiente ± Log 10	Ecuación Probit	χ <sup>2</sup>	Pr > χ <sup>2</sup>
7	0.83 a	0.613 – 1.056	1.14	y = 1.14x + 0.08	137.65	<0.0001
14	1.03 a	0.56 – 1.49	0.586	y = 0.586x – 0.009	44.17	<0.0001
21	0.588 a	0.277 – 0.921	0.634	y = 0.634x + 0.146	48.92	<0.0001
28	0.432 a	0.202 – 0.690	0.714	y = 0.714x – 0.259	57.93	<0.0001

Altura planta con Pb

Tiempo de Exposición	CE <sub>50</sub> mgL <sup>-1</sup>	Intervalo de confianza	Pendiente ± Log 10	Ecuación Probit	χ <sup>2</sup>	Pr > χ <sup>2</sup>
7	2.14 a	1.96 – 2.33	2.23	y = 2.23x + 0.74	446.31	<0.0001
14	2.15 a	1.82 – 2.47	1.19	y = 1.19x – 0.396	171.92	<0.0001
21	1.76 a	1.13 – 2.35	0.57	y = 0.57x + 0.14	43.5	<0.0001
28	1.89 a	1.65 – 2.13	1.54	y = 1.54x – 0.42	261.28	<0.0001

Longitud radical planta con Cd

Tiempo de Exposición	CE <sub>50</sub> mgL <sup>-1</sup>	Intervalo de confianza	Pendiente ± Log 10	Ecuación Probit	χ <sup>2</sup>	Pr > χ <sup>2</sup>
7	0.034 a	0.0005 – 0.158	0.4006	y = 0.4006x + 0.58	17.172	<0.0001
14	0.6866 b	0.417 – 0.96	0.8313	y = 0.8313x – 0.135	80.02	<0.0001
21	0.743 b	0.342 – 1.158	0.5629	y = 0.6297x + 0.072	40.498	<0.0001
28	0.862 b	0.6996 – 1.021	1.629	y = 1.629x – 0.1044	212.32	<0.0001

Longitud radical planta con Pb

Tiempo de Exposición	CE <sub>50</sub> mgL <sup>-1</sup>	Intervalo de confianza	Pendiente ± Log 10	Ecuación Probit	χ <sup>2</sup>	Pr > χ <sup>2</sup>
7	4.47 ab	3.86 – 5.21	1.03	y = 1.03x + 0.67	130.64	<0.0001
14	3.16 ab	2.79 – 3.57	1.275	y = 1.27x – 0.638	194.19	<0.0001
21	6.54 a	4.79 – 10.3	0.488	y = 0.488x + 0.398	31.36	<0.0001
28	2.68 b	2.33 – 3.05	1.246	y = 1.246x – 0.53	185.62	<0.0001

Para el caso de la altura de la planta no se presentó diferencia significativa con respecto al tiempo de exposición al metal aunque se observó que conforme aumentó el tiempo de exposición disminuyó la  $CE_{50}$ ; mientras que en el caso de la longitud radical se observó una diferencia entre el tiempo de exposición a los 7 días para el Cd, de acuerdo a lo observado en la tabla 16, el Cd resultó más tóxico durante los primeros 7 días posteriormente conforme la planta crece incrementa su tolerancia.

#### *Parámetros Bioquímicos*

La clorofila fue uno de los primeros parámetros que se evaluaron para determinar el efecto del metal, de los primeros síntomas de toxicidad fácilmente detectables es la clorosis que se relaciona con la disminución en la cantidad de clorofila cuantificada (Figura 24). La tendencia de la concentración de clorofila a disminuir con respecto al tiempo de exposición al metal, esto se relaciona con el desarrollo de la planta a través del tiempo. Se detectaron diferencias significativas entre concentraciones para cada tiempo, para 7 días (Cd (Fo: 315.41;  $p= 0.0000$ )/Pb (Fo: 189.75;  $p= 0.0000$ )), 14 días (Cd (Fo: 31.18;  $p= 0.0000$ )/Pb (Fo: 489.56;  $p= 0.0000$ )), 21 días (Cd (Fo: 40.09;  $p= 0.0000$ )/Pb (Fo: 67.86;  $p= 0.0000$ )) y 28 días (Cd (Fo: 67.86;  $p= 0.0000$ )/Pb (Fo: 30.76;  $p= 0.0000$ )).

En el caso de la clorofila, en el análisis del diseño factorial, los tres factores son sumamente significativos, en particular el tiempo de exposición es el factor de mayor impacto (F: 214.18;  $p=0.0000$ ), el tipo de metal también resulta ser un factor de alta significancia (F: 91.58;  $p=0.0000$ ) seguido del incremento en las concentraciones de metal (F: 32.44;  $p=0.0000$ ).

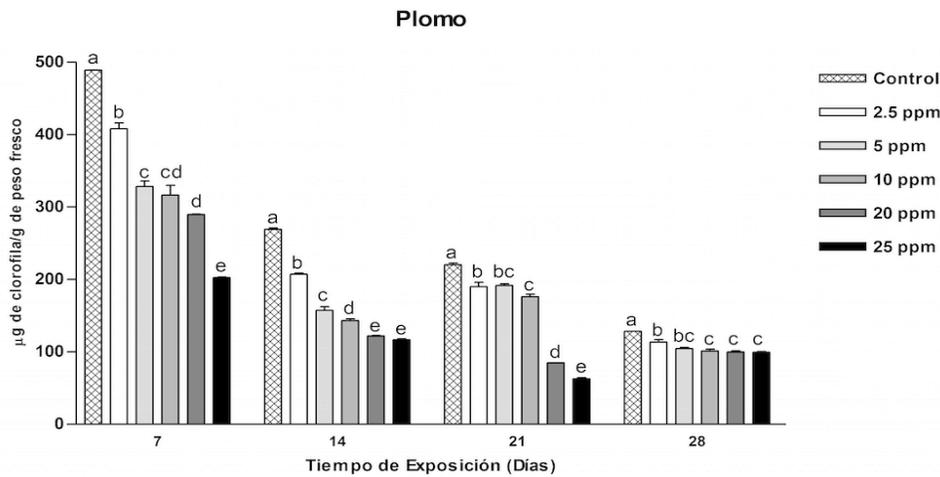
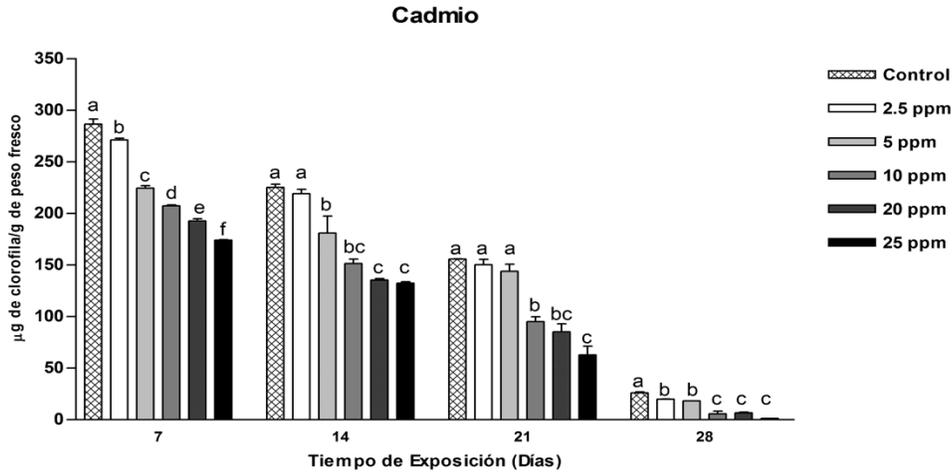


Figura 24. Cuantificación de clorofila a diferentes tiempos de exposición y a cada concentración. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí ( $n = 9$ , media  $\pm$  SEM,  $\alpha < 0,01$ ).

Para el análisis de parámetros bioquímicos se utilizaron las metodologías descritas en la sección 6.7.2; el análisis estadístico se realizó para cada parámetro con respecto a la concentración del metal, para las muestras de tejido vegetal del día 7 y el día 14 se realizaron las determinaciones solo para parte aérea debido a que no hubo suficiente densidad radical, por lo que no se contaba con suficiente cantidad de tejido vegetal para su procesamiento. En el caso de las muestras obtenidas a los 21 y 28 días las determinaciones se realizaron por separado para parte aérea y raíces, los resultados para el día 28 se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Parámetros Bioquímicos evaluados en el ensayo fitotóxico, después de 28 días de ensayo.

CADMIO

[C]	ppm	Parte aérea			Raíces		
		Peróxido mm gPF <sup>-1</sup>	Proteína mgmL <sup>-1</sup>	Azúcares mg gPF <sup>-1</sup>	Peróxido mm gPF <sup>-1</sup>	Proteína mgmL <sup>-1</sup>	Azúcares mg gPF <sup>-1</sup>
0		0.5693 ±	0.7924 ±	11.11 ±	0.2997 ±	0.7331 ±	7.47 ±
		0.5566 a	0.0854 e	1.5932 c	0.2870 ab	0.0521 d	0.1779 c
2.5		1.1981 ±	0.7389 ±	7.26 ±	0.3758 ±	0.6875 ±	6.94 ±
		0.0599 ab	0.0304 de	0.025 b	0.0486 ab	0.0036 c	0.4831 c
5		1.1732 ±	0.6085 ±	6.033 ±	0.1550 ±	0.6752 ±	4.64 ±
		0.0275 ab	0.0608 cd	0.2542 ab	0.0049 a	0.0969 b	0.3305 b
10		1.2717 ±	0.5347 ±	5.31 ±	0.3771 ±	0.4196 ±	5.60 ±
		0.0387 b	0.0159 bc	0.3728 a	0.0124 ab	0.0079 a	0.0254 a
20		1.3591 ±	0.4479 ±	4.92 ±	0.4969 ±	0.2655 ±	4.26 ±
		0.0337 b	0.0477 b	0.0847 a	0.0025 ab	0.0029 a	0.0423 a
25		1.6599 ±	0.2018 ±	4.64 ±	0.5580 ±	0.1244 ±	4.17 ±
		0.0124 b	0.0608 a	0.3898 a	0.1111 b	0.0326 a	0.0677 a

PLOMO

[C]	ppm	Parte aérea			Raíces		
		Peróxido mm gPF <sup>-1</sup>	Proteína mgmL <sup>-1</sup>	Azúcares mg gPF <sup>-1</sup>	Peróxido mm gPF <sup>-1</sup>	Proteína mgmL <sup>-1</sup>	Azúcares mg gPF <sup>-1</sup>
0		0.2261 ±	0.8503 ±	14.54 ± 0.033	0.1026 ±	0.9003 ±	5.87 ±
		0.0112 a	0.1781 a	a	0.0898 a	0.0238 a	0.2627 a
2.5		0.4832 ±	0.6933 ±	12.20 ± 0.364	0.2348 ±	0.6716 ±	5.279 ±
		0.0911 a	0.0137 ab	b	0.0249 ab	0.0051 b	0.029 a
5		0.8912 ±	0.5933 ±	9.1779 ±	0.2299 ±	0.6491 ±	4.10 ±
		0.0648 b	0.0340 bc	0.1441 c	0.0598 ab	0.0419 b	0.4576 b
10		0.9212 ±	0.5760 ±	8.2542 ±	0.1987 ±	0.4095 ±	4.178 ±
		0.0025 b	0.0311 bc	0.033 d	0.0012 ab	0.0137 c	0.0423 b
20		1.9768 ±	0.5079 ±	8.2711 ±	0.2598 ±	0.2764 ±	5.27 ±
		0.1373 c	0.0021 bc	0.0508 d	0.0499 b	0.0340 d	0.6271 a
25		2.2538 ±	0.4790 ±	5.847 ±	0.4619 ±	0.3140 ±	5.55 ±
		0.1897 c	0.0036 c	0.2542 e	0.0174 c	0.0036 d	0.059 a

A través del análisis del diseño factorial, considerando tres factores: metal (Pb y Cd), tiempo de exposición (7, 14, 21 y 28 días) y concentraciones del metal (0, 2.5, 5, 10, 20 y 25 ppm) se determinó que para el peróxido en la parte aérea. El factor de mayor significatividad resultó ser las las concentraciones de metal (F: 31.95;  $p=0.0000$  ), seguido del tiempo de exposición (F: 29.41;  $p=0.0000$  ) y del metal (F: 15.11;  $p=0.0002$ ); mientras que para el caso de la proteína en tejido vegetal se determinó que el tiempo de exposición (F: 80.56;  $p=0.0000$  ) y las concentraciones de metales (F: 44.87;  $p=0.0000$ ) son los factores de mayor significatividad, el mismo comportamiento se observó en la cantidad de azúcares totales en el tejido vegetal siendo el tiempo de exposición (F: 59.15;  $p=0.0000$ ) y el incremento en las concentraciones de metales (F: 34.78;  $p=0.0000$ ). Por último para el caso del tejido radicular el metal (F: 11.24;  $p=0.0013$ ) resultó ser más significativo para la generación de peróxido de hidrógeno. También el incremento de concentraciones de metal tuvo un efecto significativo (F: 6.11;  $p=0.0001$ ), para el caso de la proteína el tiempo de exposición fue el factor más significativo (F: 124.14;  $p=0.0000$ ), seguido de la concentración de los metales (F: 42.27;  $p=0.0000$ ) y por último el metal (F: 6.61;  $p=0.0125$ ) finalmente en el caso del contenido de azúcares en el tejido radicular solo se determinó diferencia significativa para el incremento de las concentraciones de metal (F: 27.92;  $p=0.0000$ ).

El metal que presentó mayores efectos de toxicidad resultó ser el cadmio (Cd) cuyo exceso de acumulación causa diversos síntomas de fitotoxicidad que resultan en la inhibición del crecimiento y desarrollo de la planta (Milone *et al.*, 2003), estos efectos negativos están asociados con la interferencia del Cd con varios procesos metabólicos (Liu *et al.*, 2011, Lux *et al.*, 2011). A nivel fisiológico, el Cd es capaz de interferir con la fotosíntesis (Azevedo *et al.*, 2005), por lo que uno de los efectos más evidentes de toxicidad del metal es la pérdida de clorofila, es decir, clorosis (Barylá *et al.*, 2001; Schützendübel *et al.*, 2001), por otra parte varios autores han reportado un desequilibrio de nutrientes minerales relacionado con la acumulación del cadmio (Gouia *et al.*, 2000) y la afectación de las actividades enzimáticas (Hasan *et al.*, 2009 ). En el caso del plomo se conocen sus efectos fitotóxicos que incluyen la inhibición de fotosíntesis, la germinación, el crecimiento de las plántulas, la densidad de raíces y brotes, el estado hídrico de la

planta así como su nutrición mineral, y las actividades enzimáticas (Pinho y Ladeiro, 2012). En general, los efectos son más pronunciados en concentraciones más altas y con una exposición más prolongada (Sharma y Dubey, 2005). Por lo que en este trabajo sólo se observaron efectos iniciales de la toxicidad de este metal e incluso en algunos casos, las concentraciones más bajas pueden estimular los procesos metabólicos y las enzimas que intervienen en esos procesos.

Mientras que el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), se incrementa conforme aumenta la concentración de metales como una respuesta al estrés fisiológico, por otra parte el contenido de azúcares y proteína presente en el tejido vegetal disminuyen con respecto al control y conforme aumenta la concentración de metales y el tiempo de exposición. En las plantas, las especies reactivas de oxígeno (ROS), se producen dentro de los compartimentos celulares como cloroplastos, mitocondria, citosol, membrana plasmática, microcuerpos (peroxisomas y glioxisomas), y en las paredes celulares durante procesos metabólicos como son; la fotosíntesis y la fotorrespiración (Arora *et al.*, 2002). Los tipos de especies de  $O_2$  activos son el superóxido y  $H_2O_2$ , este último es considerado como un segundo mensajero, debido a la capacidad de difusión a través de las membranas y tiene una vida media relativamente larga (Arora *et al.*, 2002). Muchos estudios han sugerido la existencia de una estrecha interacción entre  $H_2O_2$  intracelular y calcio citosólico en respuesta a estreses bióticos y abióticos. De hecho, el estrés ambiental puede provocar un aumento rápido y transitorio de la entrada de calcio (Yang y Poovaiah, 2002), lo cual incrementaría la generación de  $H_2O_2$ .

---

### 7.3.2 Ensayo de Dosificación

A partir de los resultados obtenidos en el ensayo de fitotoxicidad, se estableció un ensayo de dosificación a mayor tiempo para poder evaluar el efecto del incremento de la concentración de los metales evaluados sobre la capacidad de asimilación de fosfato y la acumulación de metal en los tejidos de *P. australis*.

### Evaluación del Crecimiento

Al final del experimento se evaluaron los parámetros agronómicos (altura y longitud radical), se evaluaron dos factores: el efecto del incremento de las concentraciones de metales  $\text{Cd}^{2+}$  (Figura 25A) y  $\text{Pb}^{2+}$  (Figura 25B) y el tipo de fuente de fosfato; después de 90 días se observó la disminución en el crecimiento y a partir de estos resultados se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento de las plantas que se sometieron a los tratamientos de dosificación.

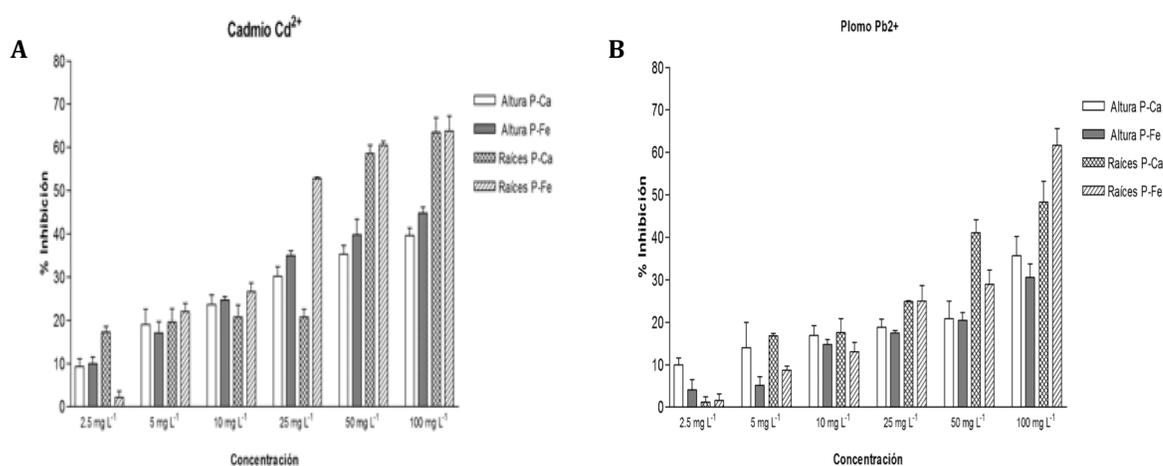


Figura 25. Porcentaje de Inhibición por  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  en el crecimiento (altura y longitud radical) de *P. australis*.

La fitotoxicidad de los metales evaluados se observó primero en las raíces de las plantas, en donde se registraron porcentajes de inhibición del crecimiento más altos, para  $\text{Cd}^{2+}$  se registraron porcentajes de 17.23 a 63.47 % para fosfato tricálcico y de 7.35 a 63.55 % para fosfato férrico por lo que el  $\text{Cd}^{2+}$  presentó mayor impacto comparado con el  $\text{Pb}^{2+}$ , que registró porcentajes de inhibición de 0 hasta 48.24% para fosfato tricálcico y de 0 a 61.61 % en fosfato férrico.

### *Cálculo de la Concentración Efectiva Media*

El efecto toxicológico se determinó a partir de la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ), este parámetro permite inferir la concentración de metal necesaria para reducir en un 50% el crecimiento. A partir de los resultados de la inhibición de crecimiento obtenidos durante el monitoreo del experimento se determinaron las concentraciones de metal que inhibirían el 50% del crecimiento de *Phragmites australis*; para  $Cd^{2+}$  se determinó 228.24 mg/L en el tratamiento con fosfato tricálcico y 119.88 mg/L en el tratamiento de fosfato férrico mientras que para  $Pb^{2+}$  se obtuvieron 1083 mg/L para fosfato tricálcico y 524.21 mg/L para fosfato férrico. Esta reducción en el crecimiento refleja el efecto de los metales evaluados sobre el desarrollo de la planta particularmente sobre la altura y la longitud radical esta última por su mayor exposición a la presencia del metal.

### *Asimilación de Fósforo*

Como se había descrito previamente, el fósforo en exceso tiene efectos negativos sobre el equilibrio del ecosistema acuático, *P. australis* ha sido reportada por su capacidad para remover el exceso de fósforo (Vymazal, 2007). De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se observó que la presencia de metales influye negativamente sobre la capacidad de asimilación de fosfato por la planta. En comparación con el control sin adición de metales, el  $Cd^{+2}$  (Figura 26A) tuvo una tendencia más notoria en la disminución de la asimilación de fosfato, 47.66 % de reducción en los tratamientos con fosfato tricálcico y 73.83 % de reducción en los tratamientos con fosfato férrico. Mientras que en el caso del  $Pb^{2+}$  (Fig. 26B) la tendencia fue más variable, pero dependió más del tipo de fosfato, para fosfato cálcico se registró una reducción de 43.71 %, mientras que para fosfato férrico se registró una reducción de 3.17 %.

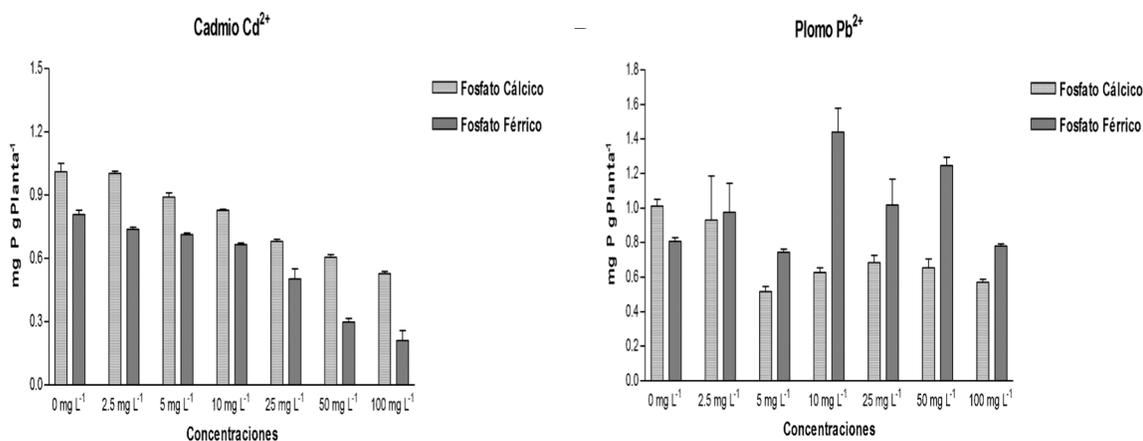


Figura 26. Porcentaje de Inhibición por Cd<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup> en el crecimiento (altura y longitud radical) de *P. australis*.

A partir de los análisis ANOVA realizados a estos resultados se determinó que en el caso del Cd<sup>2+</sup>, los factores concentración de metales (Fo= 153.37; P< 0.0001); Tipo de fosfato (Fo= 323.12; P< 0.0001) e incluso la interacción de factores (Fo= 3.71; P= 0.0077) presentaron diferencias significativas; mientras que para el caso del Pb<sup>2+</sup> el factor con mayor significancia resultó ser el tipo de fosfato (Fo= 28.03; P=0.0032). Aunque también las concentraciones de metales (Fo=4.36; P<0.0001) y la interacción de ambos factores (Fo=5.43; P=0.0008) presentaron diferencias significativas. En este estudio se estableció un sistema de dosificación que permitió la adaptabilidad de la planta a la adición de metal, sin embargo el efecto se mantuvo a lo largo del experimento. El Cd<sup>2+</sup> es el metal que presentó mayor efecto fitotóxico, siendo las raíces las que reciben el mayor impacto por la presencia de metales, ya que son el primer contacto con el metal, mientras que el comportamiento del Pb fue más variable, esto se atribuye a la movilidad del metal en los tejidos de la planta (Kozowska *et al.*, 2009) por lo que el efecto toxicológico fue más remarcado. El tipo de fosfato utilizado en la suplementación también fue uno de los factores de mayor efecto, en los tratamientos con fosfato tricálcico la reducción en el porcentaje de asimilación de fosfato fue similar, tanto en presencia de Cd<sup>2+</sup> como de Pb<sup>2+</sup>, pero en fosfato férrico la diferencia entre metales fue más marcada esto pudiera deberse a la naturaleza del hierro y a su interacción con metales (Windham *et al.*, 2003).

### *Acumulación de metales*

La acumulación de Cd y Pb se reporta en la Tabla 18, se observó que en las raíces y la parte aérea de *P. australis* que se trataron con las concentraciones más bajas de metales (2.5, 5 y 10 ppm) no presentaron incrementos significativos en la acumulación de metales ( $p= 0.0000$ ), sin embargo a concentraciones más altas (25, 50 y 100 ppm), la concentración de metales se incrementó significativamente ( $p=0.0000$ ). Para ambos metales, el aumento de la dosificación de metales fue un factor significativo (Cd (F: 147.30;  $p= 0.0000$ ), Pb (F: 9.87;  $p= 0.0000$ )), mientras que para el caso del Pb el tipo de fosfato adicionado fue un factor de alta significatividad (F: 11.49;  $p= 0.0020$ ). La mayor cantidad de acumulación se presentó en las raíces de la planta, la cual es mayor conforme se incrementa la concentración de metal adicionado, el tratamiento con Pb presentó nula acumulación en los tejidos vegetales a la concentración más baja; mientras que a la concentración de 100 ppm presentó la mayor acumulación en biomasa total (P-Ca: 19.385;  $\pm 0.8467$  mg gPlanta<sup>-1</sup> / P-Fe: 2.6858  $\pm 0.2151$  mg gPlanta<sup>-1</sup>) en comparación con el Cd (P-Ca: 1.2024  $\pm 0.1282$  mg gPlanta<sup>-1</sup> / P-Fe: 1.2753  $\pm 0.0434$  mg gPlanta<sup>-1</sup>), además en el caso del plomo se observó mayor acumulación en los tratamientos con P-Ca, tanto en parte aérea ( P-Ca: 3.01  $\pm 0.1105$  mg gPlanta<sup>-1</sup>/ P-Fe: 0.8026  $\pm 0.0691$  mg gPlanta<sup>-1</sup>) como en raíces ( P-Ca: 16.853  $\pm 0.804.06$  mg g Planta<sup>-1</sup>/ P:Fe 4.9233  $\pm 0.0955$  mg gPlanta<sup>-1</sup>). La captación de metales por lo tanto parece ser proporcional a la concentración mientras que la distribución de los metales concuerda con lo reportado en trabajos previos, lo cual demuestra que las plantas de humedales tienden a ser acumuladores en las raíces (Stoltz y Gregor, 2002).

Tabla 21 Acumulación de Cd y Pb en parte aérea, raíces y biomasa total de plantas de *P. australis* de 95 días de edad crecidas en hidroponía y expuestas durante 67 días a concentraciones de metal en soluciones con fosfato tricálcico y fosfato férrico.

		Cadmio (Cd) µg g peso seco <sup>-1</sup>			Plomo (Pb) µg g peso seco <sup>-1</sup>			
	Concentración ppm	Parte Aérea	Raíces	Total	Parte Aérea	Raíces	Total	
<b>Fosfato de Tricálcico</b>	2.5	1.44 ± 0.884 a	0.26 ± 0 a	1.7 ± 0.6888 a	0 a	0 a	0 a	
	5	7.07 ± 0.046 ab	92.3 ± 17.58 ab	99.37 ± 17.58 ab	5.79 ± 0.2261 a	24.3 ± 7.87 a	30.09 ± 7.668 a	
	10	7.43 ± 1.47 ab	182.31 ± 8.18 ab	189.75 ± 6.80 ab	26.47 ± 0.5134 a	381.3 ± 114.16 a	407.77 ± 114.37 a	
	25	8.80 ± 2.94 ab	264.91 ± 20.73 b	273.71 ± 20.88 b	167.55 ± 0.9237 a	484.8 ± 99.15 a	652.35 ± 98.51 a	
	50	22.37 ± 5.73 b	753.31 ± 9.42 c	775.68 ± 14.50 c	772.93 ± 42.80 b	5587.08 ± 95.74 b	6360.02 ± 53.73 b	
	100	47.77 ± 7.36 c	1154.64 ± 120.96 d	1202.41 ±128.29 d	3010.46 ± 110.58 c	16853.55 ±804.06 c	19385.45 ±846.72 c	
		Concentración ppm	Parte Aérea	Raíces	Total	Parte Aérea	Raíces	Total
<b>Fosfato Férrico</b>	2.5	5.40 ± 1.11 ab	0	5.40 ± 1.11 a	0 a	19.55 ± 2.37 a	19.55 ± 2.36 a	
	5	4.25 ± 0.103 a	41.58 ± 15.68 a	45.83 ± 15.63 a	5.63 ± 0.8660 a	155.62 ± 14.34 a	161.25 ± 15.14 a	
	10	10.17 ± 2.733 ab	170.11 ± 21.67 a	180.28 ± 20.62 a	20.01 ± 4.422 a	216.52 ± 48.37 a	236.54 ± 91.44 a	
	25	12.09 ± 1.35 b	184.31 ± 13.40 a	196.41 ± 13.11 a	115.8 ± 10.53 a	2911.7 ± 540.76 ab	4386.5 ± 413.53 a	
	50	11.49 ± 1.956 ab	879.31 ± 144.28 b	890.80 ± 145.79 b	802.6 ± 69.168 b	4923.37 ±95.57 ab	4868.7 ± 801.65 b	
	100	31.36 ± 1.236 c	1243.98 ± 43.92 c	1275.34 ± 43.43 c	2673.4 ± 214.55 c	8731.08 ±755.36 b	11460.58 ±1048.2 c	

Letras iguales significa que no hay diferencia significativa entre los tratamientos (p: 0.0000), Prueba de Tukey. Los valores son el promedio ± error std.

El volumen total de la solución nutritiva fue de 2150 mL correspondiente a 0, 5.38, 10.75, 21.5, 53.75, 107.5 y 215 mgL<sup>-1</sup> de metal acumulado por unidad experimental con respecto a la dosis establecida para cada tratamiento, el acumulado de metal correspondiente a parte aérea, raíces y el total que se muestra en la Tabla 19 para los tratamientos con fosfato tricálcico y en la Tabla 20, para los tratamientos con fosfato férrico.

Tabla 22a. Acumulación de metales en los tratamientos con fosfato tricálcico

Concentración	Cd acumulado por unidad experimental (mg)				Pb acumulado por unidad experimental (mg)			
	Parte aérea	Raíces	Total	(Ti)	Parte aérea	Raíces	Total	(Ti)
<b>2.5</b>	0.0514 ±	0.0125 ±	0.0639	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
	0.0325 a	0.0125 a	±					
			0.023 a					
<b>5</b>	0.1831 ±	1.7014 ±	1.884 ±	11.88 ±	0.141 ±	1.04 ±	1.18 ±	15.83 ±
	0.0405 ab	0.3462 ab	0.346	2.88 b	0.002 a	0.2956 a	0.292 a	3.96 a
			ab					
<b>10</b>	0.2043 ±	2.1993 ±	2.40 ±	9.54 ±	0.656 ±	4.20 ±	4.86 ±	18.80 ±
	0.0847 ab	0.2382 ab	0.106	2.24 ab	0.03 a	1.326 a	1.31 ab	5.10 a
			ab					
<b>25</b>	0.1937 ±	2.606 ±	2.8 ±	7.72 ±	3.78 ±	8.443 ±	12.22 ±	50.56 ±
	0.0847 ab	0.2131 b	0.193 b	3.54 ab	0.091 a	1.81 ab	1.85 b	13.37 ab
<b>50</b>	0.3019 ±	7.4537 ±	7.75 ±	4.88 ±	10.12 ±	18.94 ±	29.06 ±	52.94 ±
	0.0835 ab	0.8121 c	0.875 c	0.265 ab	1.46 b	1.372 bc	2.81 c	4.129 ab
<b>100</b>	0.04533 ±	9.4875 ±	9.94 ±	4.73 ±	26.36 ±	30.22 ±	56.59 ±	67.57 ±
	0.0682 b	0.9034 c	0.97 c	0.26 ab	2.03 b	6.00 c	3.97 d	3.69 c

Letras iguales significa que no hay diferencia significativa entre los tratamientos (p: 0.0000), Prueba de Tukey. Los valores son el promedio ± error std. Ti. Índice de Transporte de metales.

Tabla 22b. Acumulación de Metales en los tratamientos con fosfato férrico

Concentración	Cd acumulado por unidad experimental				Pb acumulado por unidad experimental			
	(mg)				(mg)			
Tratamiento ppm	Parte aérea	Raíces	Total	(Ti)	Parte aérea	Raíces	Total	(Ti)
2.5	0.083 ±	0 a	0.083 ±	0 a	0 a	0.635 ±	0.6357 ±	0 a
	0.02 a		0.0233 a			0.065 a	0.0065 a	
5	0.066 ±	0.4076 ±	0.47 ±	24.95 ±	0.2191 ±	3.433 ±	3.65 ±	6.40 ±
	±0.005 a	0.1371 a	0.135 a	12.72 a	0.0347 a	0.501 a	0.5307 a	0.641 a
10	0.100 ±	0.7467 ±	0.8474 ±	14.63 ±	0.5853 ±	2.67 ±	3.25 ±	13.01 ±
	0.022 a	0.2637 a	0.2853 a	1.89 a	0.1216 a	1.167 a	1.04 a	2.91 a
25	0.196 ±	1.48 ±	1.67 ±	14.17 ±	3.24 ±	19.52 ±	22.76 ±	16.48 ±
	0.020 b	0.297 ab	0.304 ab	2.93 a	0.4315 a	1.72 ab	2.14 ab	0.9806 b
50	0.1155 ±	2.79 ±	2.90 ±	4.81 ±	15.58 ±	27.80 ±	43.38 ±	46.22 ±
	0.003 a	0.803 b	0.806 b	1.24 a	1.44 b	8.55 bc	7.11 bc	13.51 b
100	0.2024 ±	5.64 ±	5.84 ±	3.66 ±	23.32 ±	35.77 ±	61.09 ±	59.92 ±
	0.004 b	0.5240 c	0.519 c	0.40 a	0.96 c	9.81 c	9.64 c	11.54 b

Letras iguales significa que no hay diferencia significativa entre los tratamientos (p: 0.0000), Prueba de Tukey. Los valores son el promedio ± error std. Ti. Índice de Transporte de metales.

De acuerdo con los resultados obtenidos se observó mayor acumulación de plomo en los tejidos de *P. australis*, los índices de transporte obtenidos fueron aumentando conforme se incremento la dosis de plomo adicionado a cada unidad experimental caso contrario ocurrió con el Cd, en donde los índices de transporte disminuyeron conforme se

incremento la dosis de metales, este hecho se relaciona con la toxicidad del Cd, pues ejerce un efecto fitotóxico sobre el desarrollo de la planta (Ederli *et al.*, 2004), nuevamente se presentaron diferencias significativas a las concentraciones más altas 25, 50 y 100 ppm ( $p= 0.001$ ). La mayor acumulación de metal se registró en los tratamientos con Pb con 26.32 % (P-Ca) y 28.41% (P-Fe) del metal disponible en la biomasa total; para el caso del Cd se registró menor porcentaje de acumulación de metal 4.62 % (P-Ca) y 2.55 % (P-Fe); estos resultados fueron la base del siguiente experimento en donde se evaluó la inoculación de los hongos rizosféricos previamente caracterizados, y con Cd como metal de prueba.

### 7.3.3 Ensayo de Coinoculación

#### Monitoreo de Crecimiento

Durante tres meses se registró el crecimiento de *P. australis* bajo las condiciones establecidas en los diferentes tratamientos y utilizando dos fuentes de fosfato de acuerdo a lo observado en la figura 27.

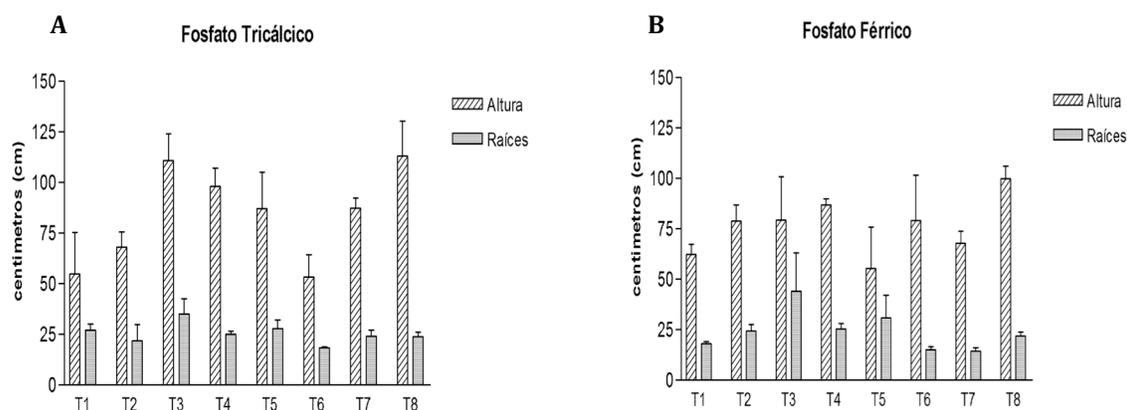


Figura 27 Crecimiento (Altura y Raíces) para cada tratamiento en presencia de Cd<sup>2+</sup> T1: *P. australis* + Micorriza + Hongo + 50 mgL<sup>-1</sup> Cd<sup>2+</sup> T2: *P. australis* + Micorriza + Hongo T3: *P. australis* + Micorriza + 50 mgL<sup>-1</sup> Cd<sup>2+</sup> T4: *P. australis* + Micorriza T5: *P. australis* + Hongo + 50 mgL<sup>-1</sup> Cd<sup>2+</sup> T6: *P. australis* + Hongo T7: *P. australis* + 50 mgL<sup>-1</sup> Cd<sup>2+</sup> T8: *P. australis*.

### *Tinción de Raíces*

Para evaluar la presencia de colonización micorrizica en la rizósfera de las plantas de *P. australis* se realizó tinción de raíces con azul tripano y los resultados se expresan en función del porcentaje de colonización micorrizica. Los tratamientos T3 y T4 presentaron los mayores porcentajes de colonización, destaca el T3 con fosfato férrico, el cual presentó un porcentaje de colonización de 70.37 %, mientras que el T4 con el mismo fosfato mostró un porcentaje de colonización de 39.25%. Para el caso del fosfato cálcico se obtuvo 30.37 % y 35.55 % de porcentaje de colonización micorrizica para el T3 y T4 respectivamente. En los tratamientos combinados se observó una mayor colonización en el T1, obteniendo porcentajes de colonización micorrizica de 11.11 % para tricálcico y 12.5 % para férrico; mientras que el T2 se observó 9.62 % para tricálcico y 8.14 % para férrico. Por lo que la presencia del metal, favorece la colonización micorrizica, que concuerda con lo reportado por Gonzalez – Chávez *et al.*, (2005).

### *Asimilación de Fósforo*

La asimilación de fosfato se observa en la figura 28, el tratamiento combinado T1, registró mayor asimilación de fósforo con el fosfato tricálcico el equivalente a 3.5 mgP gPlanta<sup>-1</sup>, seguido del tratamiento T4 que obtuvo una asimilación de 3.08 mgP gPlanta<sup>-1</sup>, para el fosfato férrico el tratamiento T3 fue el que registró mejor asimilación (2.58 mgP gPlanta<sup>-1</sup>) seguido de los tratamientos combinados T1 (0.94 mgP gPlanta<sup>-1</sup>) y T2 (1.06 mgP gPlanta<sup>-1</sup>). El inóculo micorrízico incrementó la capacidad de asimilación de fósforo en presencia del metal, lo cual ya había sido reportado por varios autores (Hildebrandt *et al.*, 2007), aunque también es destacable la acción de los hongos saprobios (Khan *et al.*, 2007).

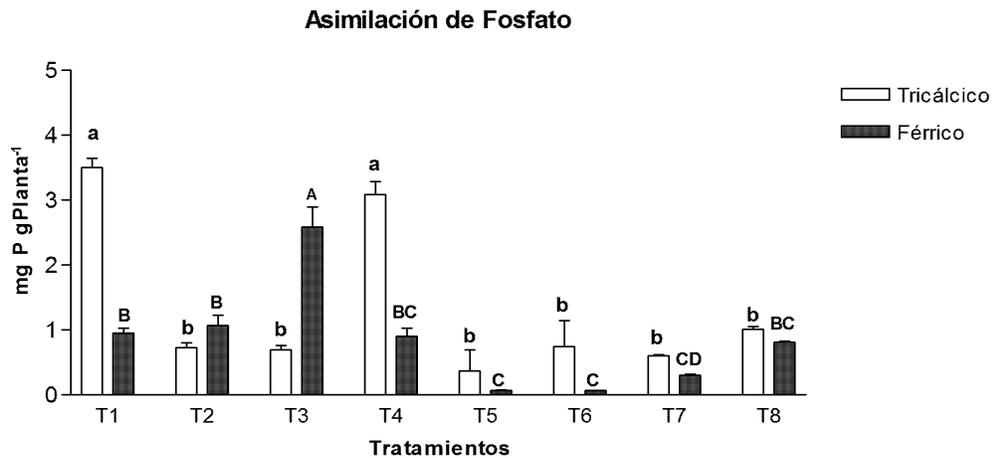


Figura 28 Asimilación de fosfato para cada tratamiento en presencia de  $\text{Cd}^{2+}$ : T1: *P. australis* + Micorriza + Hongo +  $50 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$  T2: *P. australis* + Micorriza + Hongo T3: *P. australis* + Micorriza +  $50 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$  T4: *P. australis* + Micorriza T5: *P. australis* + Hongo +  $50 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$  T6: *P. australis* + Hongo T7: *P. australis* +  $50 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$  T8: *P. australis*.

El análisis estadístico ANOVA, permitió determinar los factores significativos evaluados, siendo los factores de mayor significancia: Tipo de tratamiento ( $F_0 = 39.78$ ;  $P < 0.0001$ ), Tipo de fosfato ( $F_0 = 33.73$ ;  $P < 0.0001$ ) e inclusive la interacción entre factores ( $F_0 = 33.07$ ;  $P < 0.0001$ ). La asimilación de fosfato es un proceso complejo, en el cual intervienen muchos mecanismos, la participación de los microorganismos asociados a la rizósfera es crucial para que este proceso se lleve a cabo, la actividad metabólica de estos microorganismos. Particularmente la micorriza arbúscular y los hongos saprobios influyó incrementó la capacidad de asimilación de la planta (Marschner *et al.*, 2011).

#### *Acumulación de metales*

Para el experimento de co-inoculación se trabajó con una concentración de  $210 \text{ mg L}^{-1}$ , repartida en 4 dosis de  $52.5 \text{ mg L}^{-1}$ , al inicio del experimento se adicionó solamente la solución nutritiva durante 28 días, posteriormente se adicionó la primera dosis al día 30, y posteriormente al día 45, día 60 y día 90, la cosecha de las plantas se realizó al día 95.

La mayor acumulación de cadmio se observó en el tratamiento con inoculación dual, en los tratamientos con fosfato tricálcico, en la tabla 21 se muestran los valores de acumulación de metales para cada tratamiento, también se observa que los tratamientos con inoculación limitaron la acumulación de metales en la parte aérea, las diferencias significativas se observaron entre los tratamientos con inoculación y los que no tenían inoculación. De acuerdo con Chen *et al.*, (2001), la micorriza arbuscular pueden mejorar la nutrición de la planta e incrementa el crecimiento de las plantas, por lo que el efecto del metal se diluye, debido a la unión del metal a la micelio fúngico o la inmovilización en las raíces.

Tabla 23. Acumulación de Metales en los tratamientos con inoculación dual, inoculación con micorriza, inoculación con hongo solubilizador de fosfato y sin inoculación.

Concentración $\mu\text{g Cd g}^{-1}$				
Fosfato	Tratamiento	Parte Aérea	Raíces	Total
<b>Fosfato Tricálcico</b>	Inoculación dual	0.08616 $\pm$ 0.1291 a	64.11 $\pm$ 11.87 a	64.98 $\pm$ 11.75 a
	Micorriza	1.245 $\pm$ 0.0317 a	14.39 $\pm$ 3.47 a	15.63 $\pm$ 3.51 a
	Hongo Solubilizador	1.08 $\pm$ 0.3059 a	14.15 $\pm$ 1.15 a	15.24 $\pm$ 1.24 a
	Sin Inoculación	4.91 $\pm$ 1.41 b	8.165 $\pm$ 2.84 b	13.08 $\pm$ 3.11 b
<b>Fosfato Férrico</b>	Inoculación dual	1.535 $\pm$ 0.0548 a	5.91 $\pm$ 2.16 a	7.45 $\pm$ 2.21 a
	Micorriza	3.61 $\pm$ 0.6726 ab	14.25 $\pm$ 1.59 a	17.86 $\pm$ 0.97 ab
	Hongo Solubilizador	4.041 $\pm$ 1.135 ab	14.93 $\pm$ 1.38 b	18.97 $\pm$ 1.95 bc
	Sin Inoculación	7.30 $\pm$ 1.40 b	2.92 $\pm$ 0.0014 b	10.23 $\pm$ 1.40 c

Letras iguales significa que no hay diferencia significativa entre los tratamientos ( $p < 0.005$ ), Prueba de Tukey. Los valores son el promedio  $\pm$  error std

La presencia de *P. italicum* incrementó la colonización micorrízica en comparación con la inoculación individual de hongos micorrizicos arbusculares, además de favorecer la solubilización de fosfato, los hongos saprobios incrementan la colonización micorrizica de la raíz mediante la producción de metabolitos específicos, por lo que ejercen un efecto sinérgico sobre el consorcio micorrízico (Barea et al., 2005); de acuerdo con Arriagada *et*

*al.*, (2004), los hongos endófitos tienen influencia sobre la captación de metales pesados desde el sitio contaminado e incrementan la colonización de micorrízica, lo cual favorece los procesos de sorción de metales que pueden estar presentes en niveles tóxicos (Ning, 2000). La micorriza puede mejorar la asimilación de nutrientes en particular de fósforo, además de aumentar el crecimiento de las plantas mediante la dilución de efecto tóxico ejercido del metal sobre la planta huésped o por la unión del metal al micelio fúngico y posterior inmovilizarlos en la rizosfera o raíces (Chen *et al.*, 2007). Los tratamientos de inoculación no presentaron diferencias significativas con respecto al crecimiento de las plantas de *P. australis* en comparación con el tratamiento no inoculado. La mayor acumulación ocurrió a nivel de raíces disminuyendo la posibilidad de traslocación de  $Cd^{2+}$  hacia la parte aérea.

## 8. CONCLUSIONES

A través de este trabajo se demuestra la capacidad innata de los microorganismos asociados a la rizosfera de plantas de los humedales para solubilizar fosfato, que desempeñan un papel importante en la nutrición de la planta. Además, se demostró que la presencia de microorganismos rizosféricos tienen la capacidad de solubilizar el fosfato, aún en presencia de metales, por lo que le confieren tolerancia a la planta, sin embargo limitan la acumulación de los metales en los tejidos superiores de la planta, puesto que la mayor acumulación del metal se observó en la raíz.

Las cepas fúngicas evaluadas en este estudio son capaces de solubilizar fosfato tricálcico y cuentan con una capacidad limitada para solubilizar fosfato férrico; la capacidad para solubilizar fosfato está directamente relacionada con la disminución del pH del medio extracelular, causada por la generación de ácidos orgánicos a través del metabolismo fúngico. Sin embargo, se ha demostrado, que este no es el único mecanismo implicado en la solubilización de fosfato, puesto que también la enzima fosfatasa participa en la solubilización de fosfato.

Además en este estudio se determinó que el peróxido de hidrógeno producido por parte de las cepas fúngicas está involucrado indirectamente en la solubilización de fosfato puesto que favorecen la disminución del pH a través de la protonación del medio, que pueden estar favoreciendo diversas reacciones de óxido-reducción y que permiten la liberación del fosfato.

A través de ensayos dosis respuesta se determinó la capacidad de las cepas fúngicas asociadas a la rizosfera de *P. australis* para tolerar el incremento de las concentraciones de metales pesados, y la actividad de solubilización de fosfato se mantiene constante a pesar de la reducción en el crecimiento micelial. Los metales como el  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Cr}^{6+}$  son los que tuvieron menor  $\text{CE}_{50}$ , por lo que se consideraron los de mayor toxicidad. Se mostró que las cinco cepas evaluadas resultaron tolerantes al incremento de las concentraciones de  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Al}^{3+}$ , sin embargo metales como el  $\text{Ni}^{2+}$  también fueron capaces de limitar el

crecimiento y desarrollo de las cepas. El hongo *P.italicum* demostró la mayor capacidad de solubilización de fosfato en presencia de metales pesados. En particular los nutrientes como el nitrógeno en forma de sulfato de amonio y la glucosa, están directamente relacionados con el incremento de la capacidad de solubilización de fosfato, debido a que favorecen la generación de ácidos orgánicos que favorecen el decremento del pH. Adicionalmente se mostró que la presencia del metal limita el crecimiento de las cepas en medio líquido, sin embargo la actividad metabólica se mantiene y esto permite que la solubilización de fosfato.

*Phragmites australis* resulta ser una especie eficiente en la remoción de nutrientes y contaminantes, puesto que posee un rápido crecimiento y características, que le permiten crecer en diferentes ambientes. Además de que La presencia de metales tiene una influencia negativa sobre la capacidad de asimilación de fósforo, siendo el  $Cd^{2+}$ , el elemento de mayor fitotoxicidad y afectación al mecanismo fisiológico conforme la concentración aumenta de 0 a 100 ppm, con una tendencia dirigida al decremento de la capacidad de asimilación de fósforo conforme se incrementa la concentración del metal; En el caso del  $Pb^{2+}$  se observó una mayor tolerancia al incremento de las concentraciones del metal y mayor capacidad de acumulación en los tejidos de la planta. Cuando se realiza la inoculación micorriza arbúscular en combinación con el hongo *P. italicum*, se observó que no tuvo una influencia sobre el crecimiento de las plantas de *P. australis*, sin embargo redujo la acumulación del  $Cd^{2+}$  en la parte aérea de la planta.

## 9. PERSPECTIVAS

El estudio de los sistemas de tratamiento de aguas mediante humedales es considerado un sistema complejo debido a la gran variedad de interacciones que se llevan a cabo dentro del sistema, por lo que por lo general se les ha considerado una caja negra, es por eso que en este trabajo nos enfocamos en el estudio individual de las interacciones a partir del análisis de sus componentes principales lo cual incluye (plantas, microorganismos, naturaleza del agua residual y soporte).

Para este trabajo *Phragmites australis* fue considerada un nicho ecológico para el desarrollo de interacciones microbianas, aunque se evaluaron los efectos fitotóxicos, la capacidad de asimilación de fosfato y la acumulación de metales sería interesante considerar algunos otros aspectos metabólicos de *P. australis* o desarrollarlos a mayor profundidad en relación a la interacción simbiótica con los microorganismos además en presencia de los elementos potencialmente tóxicos evaluados. Por otra parte sería recomendable estudiar en mayor detalle la interacción entre fósforo y metales pesados evaluados para determinar si dicha interacción influye sobre la biodisponibilidad de los metales hacia la planta o hacia el microorganismo.

Los microorganismos evaluados en este estudio se enfocaron en especies fúngicas simbióticas relacionadas con la asimilación de fosfato, no obstante es probable encontrar una gran variedad de microorganismo que también pudieran tener participación en el proceso de asimilación de fosfato como pueden ser especies bacterianas e inclusive microalgas por lo que para trabajos futuros se recomendaría una caracterización microbiológica completa de los microorganismos asociados a la rizósfera.

Aunque este trabajo se enfoco en la capacidad de solubilización de fosfato por parte de los hongos aislados de la rizósfera, es probable que estos microorganismos pudieran utilizarse para otras aplicaciones como la remoción de metales a través de fenómenos de sorción, dichos fenómenos pudieran estudiarse en trabajos futuros utilizando las cepas identificadas en este estudio.

## 10. REFERENCIAS

1. Ahn J, Daidou T, Tsuneda S, Hirata A. (2001). Selection and dominance mechanisms of denitrifying phosphate-accumulating organisms in biological phosphate removal process. *Biotechnol Lett.*, 23(24), 2005-2008.
2. Alarcón A, Ferrera-Cerrato R, González-Chávez MC, Villegas-Monter A. (2000). Hongos micorrízicos arbusculares en la dinámica de aparición de estolones y nutrición de plantas de fresa cv. Fern obtenidas por cultivo in vitro. *Terra*, 18(3), 212.
3. Ali H, Khan E, Sajad MA. (2013). Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere*. 91: 869–881
4. Al-Falih MA (2005) Phosphate solubilization *in vitro* by some soil yeasts. *Qatar Univ Sci. J* 25: 119-125.
5. Álvarez-Cobelas M, Sánchez-Carrillo S, Cirujano S, Angeler DG. (2010). A story of the wetland water quality deterioration: salinization, pollution, eutrophication and siltation. In *Ecology of Threatened Semi-Arid Wetlands* (pp. 109-133). Springer Netherlands.
6. Anahid S, Yachmaei S, Ghobadinejad Z. (2011). Heavy metal tolerance of fungi. *Sci. Iran*. 18: 508–508.
7. Antonielli M, Pasqualini S, Batini P, Ederli L, Massacci A, Loreto F. (2002). Physiological and anatomical characterisation of *Phragmites australis* leaves. *Aquat Bot.* 72(1). 55-66.
8. Arora A, Sairam RK, Srivastava GC. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr Sci Bangalore*. 82(10): 1227-1238.
9. Arriagada CA, Herrera MA, Garcia-Romera I, Ocampo JA. (2004). Tolerance to Cd of soybean (*Glycine max*) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) inoculated with arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi. *Symbiosis* 36: 285–299.
10. Arthur E, Rice P, Anderson T, Baladi S, Henderson K, and Coats J. (2005) Phytoremediation: An overview. *Crit. Rev. Plant Sci*. 24: 109–122.

11. Asaeda T, Manatunge J, Roberts J, Hai DN. (2006). Seasonal dynamics of resource translocation between the aboveground organs and age-specific rhizome segments of *Phragmites australis*. *Environ Exp Bot.* 57(1): 9-18.
12. Augé RM (2001). Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza.* 11(1): 3-42.
13. Azevedo H, Glória Pinto CG, Fernandes J, Loureiro S, Santos C. (2005). Cadmium effects on sunflower growth and photosynthesis. *J Plant Nutr.* 28(12): 2211-2220.
14. Azevedo M, Carvalho A, Pascoal C, Rodrigues F, Cassio F. (2007) Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi. *Sci Total Environ.* 377 (2-3): 233-243.
15. Badar U, Ahmed N, Beswick AJ, Pattanapitpaisal P, Macaski LE. (2000) Reduction of chromate by microorganisms isolated from metal contaminated sites of Karachi. Pakistan. *Biotechnol Lett.* 22: 829-836.
16. Bai Z, Harvey LM, McNeil B. (2003) Oxidative stress in submerged cultures of fungi. *Crit Rev Biotechnol:* 23(4): 267-302
17. Bai RS, Abraham TE. (2003). Studies on chromium (VI) adsorption desorption using immobilized fungal biomass. *Biores Technol.* 87: 17 – 26.
18. Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Ann. Rev. Plant Biol.* 57: 233-266.
19. Baldrian P. (2003) Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microb Technol.* 32(1): 78 – 91.
20. Baldrian P, Gabriel J. (2003) Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. *FEMS Microbiol Lett.* 220(2): 235 – 240.
21. Baptista JDC, Donnelly T, Rayne D, Davenport RJ. (2003). Microbial mechanisms of carbon removal in subsurface flow wetlands. *Water Sci. Tech.* 48(5): 127-134.
22. Barea JM, Pozo MJ, Azcón R, Azcón-Aguilar C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *J Exp Bot.* 56: 1761-1778.
23. Barylá A, Carrier P, Franck F, Coulomb C, Sahut C, Havaux M. (2001). Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil:

- causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta*. 212(5-6): 696-709.
24. Barroso CB, Nahas E. (2005). The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. *App Soil Ecol*. 29(1): 73-83.
  25. Barroso CB, Pereira GT, Nahas E. (2006). Solubilization of CaHPO<sub>4</sub> and AlPO<sub>4</sub> by *Aspergillus niger* in culture media with different carbon and nitrogen sources. *Braz J Microbiol*. 37(4): 434-438.
  26. Barroso CB, Nahas E. (2013). Enhanced solubilization of iron and calcium phosphates by *Aspergillus niger* by the addition of alcohols. *Braz Arch Biol Techn*. 56(2): 181-189.
  27. Bauer CR, Kellogg CH, Bridgham SD, Lamberti GA. (2003). Mycorrhizal colonization across hydrologic gradients in restored and reference freshwater wetlands. *Wetlands*. 23(4): 961-968.
  28. Bennett EM, Carpenter SR, Caraco NF. (2001). Human impact on erodable phosphorus and eutrophication: A global perspective. *BioScience*. 51: 227-234.
  29. Berg G, Smalla K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol*. 68(1): 1-13.
  30. Berlanga – Padilla JLG, Acosta Díaz, E. Efectividad de hongos entomopatógenos y vehículos de aplicación para el control del pulgón café de los cítricos *Toxoptera citricida kirkaldy* (*Homoptera: Aphididae*)
  31. Bohrer KE, Friese CF, Amon JP. (2004). Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in differing wetland habitats. *Mycorrhiza*. 14(5), 329-337.
  32. Bonanno G, Giudice RL. (2010). Heavy metal bioaccumulation by the organs of *Phragmites australis* (common reed) and their potential use as contamination indicators. *Ecol Indic*. 10(3): 639-645.
  33. Borowicz VA. (2001). Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant-pathogen relations?. *Ecology*. 82(11): 3057-3068.
  34. Bragato C, Brix H, Malagoli M. (2006). Accumulation of nutrients and heavy metals in *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel and *Bolboschoenus*

- maritimus* (L.) Palla in a constructed wetland of the Venice lagoon watershed. *Environ Pollut.* 144(3), 967-975.
35. Burford EP, Fomina M, Gadd GM. (2003). Fungal involvement in bioweathering and biotransformation of rocks and minerals. *Mineral Mag.* 67(6): 1127-1155.
  36. Buée M, De Boer W, Martin F, Van Overbeek L, Jurkevitch E. (2009). The rhizosphere zoo: an overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant Soil.* 321(1-2): 189-212.
  37. Cakmakç, R, Dönmez MF, Ertürk Y, Erat M, Haznedar A, Sekban R. (2010) Diversity and metabolic potential of culturable bacteria from the rhizosphere of Turkish tea grown in acidic soils. *Plant Soil.* 332: 299–318.
  38. Carpenter, S.R. (2005). Eutrophication of aquatic ecosystems: bistability and soil phosphorus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 10002–10005.
  39. Carvalho LM, Caçador I, Martins-Loução M. (2001). Temporal and spatial variation of arbuscular mycorrhizas in salt marsh plants of the Tagus estuary (Portugal). *Mycorrhiza*, 11(6), 303-309.
  40. Chai B, Wu Y, Liu P, Liu B, Gao M (2011) Isolation and phosphate-solubilizing ability of a fungus, *Penicillium* sp. from soil of an alum mine. *J Basic Microbiol.* 51(1): 5-14.
  41. Chaiharn M, Lumyong S (2009) Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. *World J Microbiol Biotechnol.* 25(2): 305-314.
  42. Challen MP, Moore AJ, Martinez-Carrera D. (1995) Facile extraction and purification of filamentous fungal DNA. *BioTechniques.* 18(6): 975-978.
  43. Chaturvedi S, Chandra R, Rai V. (2006). Isolation and characterization of *Phragmites australis* (L.) rhizosphere bacteria from contaminated site for bioremediation of colored distillery effluent. *Ecol Eng.* 27(3): 202-207.
  44. Chehregani A, Malayeri BE. (2007). Removal of heavy metals by native accumulator plants. *Int J Agri Biol.* 9: 462–465.

45. Chen B, Christie P, Li X. (2001). A modified glass bead compartment cultivation system for studies on nutrient and trace metal uptake by arbuscular mycorrhiza. *Chemosphere*. 42(2): 185-192.
46. Chen CR, Condron LM, Davis MR, Sherlock RR. (2002) Phosphorus dynamics in the rhizosphere of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and radiata pine (*Pinus radiata* D. Don.). *Soil Biol Biochem*. 34(4): 487–499.
47. Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT. (2005) Phosphate- solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate-solubilizing abilities. *Appl Soil Ecol*. 34: 33–41.
48. Chen BD, Zhu YG, Duan J, Xiao XY, Smith SE. (2007). Effects of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on growth and metal uptake by four plant species in copper mine tailings. *Environ Pollut*. 147(2): 374-380.
49. Chuang CC, Kuo YL, Chao CC, Chao WL. (2007). Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biol Fertil Soils*. 435: 575-584.
50. Chung H, Park M, Madhaiyan M, Seshadri S, Song J, Cho H, Sa T. (2005). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biol Biochem*. 37(10): 1970-1974.
51. Clark RB, Zeto SK (2000) Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *J Plant Nutr*. 23(7): 867-902.
52. Clemens S, Palmgren MG, Krämer U. (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci*. 7(7): 309-315.
53. Coutinho FP, Cavalcanti MADQ, Yano-Melo AM. (2011). Phosphate-solubilizing fungi isolated from a semiarid area cultivated with melon (*Cucumis melo* L. cv. gold mine). *Acta Bot Brasil*. 25(4): 929-931.
54. Datta, P., Kulkarni, M. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungal diversity in sugarcane rhizosphere in relation with soil properties. *Not Sci Biol*, 4(1), 66-74.
55. de- Bashan LE, Bashan Y. (2004) Recent advances in removing phosphorous from wastewater and its future use as fertilizer (1997-2003). *Water Res*. 38: 4222-4246.

56. Deepa V, Aadarsh P, Balakrishna MP, Sridhar R. (2010). Efficient phosphate solubilization by fungal strains isolated from rice-rhizosphere soils for the phosphorus release. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 6(4): 487-492.
57. Detmann H, Hiltner L, Störmer K. (1904). Die Bakterienflora des Ackerbodens, mit besonderer Berücksichtigung ihres Verhaltens nach einer Behandlung mit Schwefelkohlenstoff und nach Brache.
58. Divan AM, de Oliveira PL, Perry CT, Atz VL, Azzarini-Rostirola LN, Raya-Rodriguez MT. (2009). Using wild plant species as indicators for the accumulation of emissions from a thermal power plant, Candiota, South Brazil. *Ecol Indic.* 9(6): 1156-1162.
59. Dong J, Mao WH, Zhang GP, Wu FB, Cai Y. 2007. Root excretion and plant tolerance to cadmium toxicity – a review. *Plant Soil Environ.* 53:193 – 200.
60. Dodd JC, Dougall TA, Clapp JP, Jeffries P. (2002). The role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant community establishment at Samphire Hoe, Kent, UK—the reclamation platform created during the building of the Channel tunnel between France and the UK. *Biodivers Conserv.* 11: 39–58.
61. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers P, Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28(3): 350-356.
62. Duenas JF, Alonso JR, Rey AF, Ferrer AS, (2003). Characterisation of phosphorous forms in wastewater treatment plants. *J. Hazard Mater.* 97: 1–3.
63. Ederli L, Reale L, Ferranti F, Pasqualini S. (2004). Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. *Physiol Plantarum.* 121(1): 66-74.
64. Engloner AI. (2009). Structure, growth dynamics and biomass of reed (*Phragmites australis*)—A review. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 204(5), 331-346.
65. Erakhrumen A, Agbontalor A. (2007). Phytoremediation: an environmentally sound technology for pollution prevention, control and remediation in developing countries. *Educ Res Rev.* 2(7): 151-156.

66. Ezzouhri L, Castro E, Moya M, Espinola F, Lairin K. (2009) Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. *Afr. J. Microbiol. Res.* 3: 35-48.
67. Faulwetter, J.L., Gagnon, V., Sundberg, C., Chazarenc, F., Burr, M.D., Brisson, J., Camper, A.K., Stein, O.R., 2009. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: a review. *Ecol. Eng.* 35: 987–1004.
68. Fediuc E, Erdei L. (2002) Physiological and biochemical aspects of cadmium toxicity and protective mechanisms induced in *Phragmites australis* and *Typha latifolia*. *J Plant Physiol* 159: 265–271
69. Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A. (2007). Rizósfera: Interacción, suelo, planta y microorganismos. *Fuentes-Dávila G, Ferrera-Cerrato R (Eds.) Ecología de la Raíz. Sociedad Mexicana de Fitopatología. Cd. Obregón, México, 1-26.*
70. Fomina MA, Ritz K, Gadd GM (2003) Nutritional influence on the ability of fungal mycelia to penetrate toxic metal-containing domains. *Mycol Res.* 107(7): 861-871.
71. Fomina MA, Alexander IJ, Colpaert JV, Gadd GM (2005) Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem.* 37(5): 851–866
72. Fuchs B, Haselwandter K. (2004). Red list plants: colonization by arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes. *Mycorrhiza*, 14(4), 277-281.
73. Fulekar M, Singh A, Bhaduri AM. (2009). Genetic engineering strategies for enhancing phytoremediation of heavy metals. *Afr. J. Biotechnol.* 8: 529–535.
74. Gadd GM. (2000) Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiol-SGM.* 156: 609–643.
75. Gadd GM (2004) Microbial influence on metal mobility and application to bioremediation. *Geoderma.* 122(2-4): 109-119.
76. Gadd GM. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiol.* 156(3), 609-643.
77. Gagnon V, Chazarenc F, Comeau Y, Brisson J. (2007). Influence of macrophyte species on microbial density and activity in constructed wetlands. *Water Sci Technol.* 56(3): 249-254.

78. George TS, Gregory PJ, Wood M, Read D, Buresh RJ. (2002). Phosphatase activity and organic acids in the rhizosphere of potential agroforestry species and maize. *Soil Biol Biochem.* 34(10): 1487-1494.
79. Gerdemann JW, Nicolson TH. (1963). Spores of mycorrhizal 'Endogone' extracted from soil by wet sieving and decanting.
80. Gerhardt KE, Huang XD, Glick BR, Greenberg BM. (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Sci.* 176(1): 20-30.
81. Ghosh M, Singh SP. (2005). A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Asian J Energy Environ.* 6(4): 18.
82. Ginn T, Sengor SS, Barua S, Moberly J, Peyton B. Metal toxicity effects on microbial growth and degradation, Slovenia and U.S. Workshop on Environmental Science and Engineering. 2006; 39-40. Ljubljana, Slovenia.
83. Gómez-Guiñan YRMA, Zabala M. (2001). Determinación de la capacidad solubilizadora del P en hongos aislados de la rizósfera del maní (*Arachis hypogaea L.*).
84. Gonzalez-Chavez C, Harris PJ, Dodd J, Meharg AA. (2002). Arbuscular mycorrhizal fungi confer enhanced arsenate resistance on *Holcus lanatus*. *New Phytol.* 155(1): 163-171.
85. González - Chávez MC, Vangronsveld J, Colpaert J, Leyval C. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi and heavy metals: Tolerance mechanisms and potential use in bioremediation, pp. 211-234. In: PRASAD, M.N.V.; SAJWAN, K. S.; NAIDU, R. (eds.). Trace Elements in the Environment. Biogeochemistry, Biotechnology, and Bioremediation. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
86. Gouia H, Ghorbal MH, Meyer C. (2000). Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiol Biochem.* 38(7): 629-638.
87. Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin H, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Shachar-Hill Y. (2005). Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature.* 435(7043): 819-823.

88. Gulati A, Sharma N, Vyas P, Sood S, Rahi P, Pathania V, Prasad R. (2010). Organic acid production and plant growth promotion as a function of phosphate solubilization by *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 isolated from the cold deserts of the trans-Himalayas. *Arch Microbiol.* 192(11): 975-983.
89. Guntenspergen GR, Peterson SA, Leibowitz SG, Cowardin LM. (2002). Indicators of wetland condition for the Prairie Pothole Region of the United States. *Environ Monit Assess.* 78(3): 229-252.
90. Gyaneshwar P, Kumar GN, Parekh LJ, Poole PS. (2002) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil.* 245(1):83-93
91. Hamdali H, Bouizgarne B, Hafidi M, Lebrihi A, Virolle MJ, Ouhdouch Y. (2008) Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Appl Soil Ecol.* 38(1): 12-19.
92. Hammel KE, Kapich AN, Jensen KA, Ryan ZC (2000) Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme Microb Technol.* 30(4): 445-453.
93. Hasan SA, Fariduddin Q, Ali B, Hayat S, Ahmad A. (2009). Cadmium: toxicity and tolerance in plants.
94. Hawkins HJ, Johansen A, George E. (2000). Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil.* 226(2): 275-285.
95. Hechmi N, Aissa NB, Jedidi N (2014) Evaluating the phytoremediation potential of *Phragmites australis* growth in pentachlorophenol and cadmium co-contaminated soils. *Environ. Sci. Pollut. Res Int.* 21(2): 1304-1313.
96. Hernández-Leal TI, Carrión G, Heredia G. (2011). Solubilización in vitro de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia.* 45(8): 881-892.
97. Hernández – Montiel LG, Ochoa JL (2007) Fruit Rot Caused by *Penicillium italicum* on Lemon (*Citrus aurantifolia*) in Colima, Mexico. *Plant Dis.* 91(6): 767-777.

98. Heugens EH, Hendriks AJ, Dekker T, Straalen NMV, Admiraal W. (2001). A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment. *Crit Rev Tox.* 31(3): 247-284.
99. Hodge A, Campbell CD, Fitter AH. (2001). An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature.* 413(6853): 297-299.
100. Hofer U. Fungal pathogenesis: Good copper, bad copper. *Nature Rev. Microbio.* 2013; 11: 299
101. Howarth R W (2008). Coastal nitrogen pollution: a review of sources and trends globally and regionally. *Harmful Algae.* 8(1): 14-20.
102. Huerta G, Martínez-Carrera D, Sánchez JE, Leal-Lara E, Vilgalys R. (2010). Genetic relationships between Mexican species of *Pleurotus* analyzing the ITS-region from rDNA. *Mycol Appl Int.* 22(1): 15-25.
103. Ivorra N, Hettelaar J, Kraak MH, Sabater S, Admiraal W. (2002). Responses of biofilms to combined nutrient and metal exposure. *Environ Tox Chem.* 21(3): 626-632.
104. Imfeld G, Braeckevelt M, Kusch P, Richnow HH (2009) Monitoring and assessing processes of organic chemicals removal in constructed wetlands. *Chemosphere.* 74: 349-362
105. Ipsilantis I, Sylvia DM. (2007). Interactions of assemblages of mycorrhizal fungi with two Florida wetland plants. *Applied Soil Ecol.* 35(2): 261-271.
106. Iskandar NL, Zainudin N, Tan SG. (2011) Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem. *J Environ Sci.* 23: 824-830.
107. Jacob DL, Otte ML. (2003) Conflicting processes in the wetland plant rhizosphere: metal retention or mobilization? . *Water Air Soil Pollut.* 3: 91-104.
108. Jeffries P, Gianinazzi S, Perotto S, Turnau K, Barea JM. (2003). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol Fert Soils.* 37(1): 1-16.

109. Johnson SE, Loeppert RH. (2006). Role of organic acids in phosphate mobilization from iron oxide. *Soil Sci Soc Am J.* 70(1): 222-234.
110. Kadlec, R.H. and S.D. Wallace. 2008. Treatment wetlands. CRC Press, Boca Raton.
111. Kandeler E, Marschner P, Tscherko D, Gahoonia TS, Nielsen NE. (2002). Microbial community composition and functional diversity in the rhizosphere of maize. *Plant Soil.* 238(2): 301-312.
112. Kapri A, Tewari L. (2010). Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. *Brazil J Microbiol.* 41(3): 787-795.
113. Khan AG (2005) Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J Trace Elem Med Biol.* 18(4): 355-364.
114. Khan FA, Ansari AA. (2005). Eutrophication: an ecological vision. *Bot Rev.* 71(4): 449-482.
115. Khan MS, Zaidi A, Wani PA (2007) Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - a review. *Agron. Sustain. Dev.* 27(1): 29-43.
116. Khan MS, Zaidi A, Ahemad M, Oves M, Wani PA. (2010) Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi-current perspective. *Arch Agron Soil Sci.* 56(1): 73-98.
117. Kiviat E, Hamilton E. (2001). *Phragmites* use by native North Americans. *Aquat Bot.* 69(2): 341-357.
118. Klassen NV, Marchington D, MCGowan HCE (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Determination by the I<sub>3</sub>-method and by KMnO<sub>4</sub> titration. *Anal Chem.* 66(18): 2921-2925.
119. Kozlova OV, Egorov SY, Kupriyanova-Ashina FG. 2010. The Relationship between cellular and calcium responses of *Aspergillus awamori* to external influences. *Microbiol.* 79: 294-299.
120. Kozłowska-Szerenos B, Jarosz A, Maleszewski S. (2009). Photosynthetic net O<sub>2</sub> evolution enhancement as a sign of acclimation to phosphorus deficiency in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves. *Photosynthetica.* 47(2): 271-276.

121. Landi L, Renella G, Moreno JL, Falchini L, Nannipieri P. (2000). Influence of cadmium on the metabolic quotient, L-: D-glutamic acid respiration ratio and enzyme activity: microbial biomass ratio under laboratory conditions. *Biol Fert Soils*. 32(1): 8-16.
122. Larue C, Korboulewsky N, Wang R, Mévy JP. (2010). Depollution potential of three macrophytes: exudated, wall-bound and intracellular peroxidase activities plus intracellular phenol concentrations. *Biores Technol*. 101(20): 7951-7957.
123. Lesage E, Mundia C, Rousseau DPL, Van de Moortel AMK, du Laing G, Meers E, Tack FMG, De Pauw N, Verloo MG. (2007). Sorption of Co, Cu, Ni and Zn from industrial effluents by the submerged aquatic macrophyte *Myriophyllum spicatum* L. *Ecol Eng*. 30: 320 – 325.
124. Levinskaite L. (2002). Response of soil fungi to chromium(VI). *Ekologija*. 1: 10-13.
125. Li Q, Harvey LM, McNeil B (2009) Oxidative stress in industrial fungi. *Cri Rev Biotechnol*. 29(3): 199–213.
126. Liu J, Dong Y, Xu H, Wang D, Xu J. (2007). Accumulation of Cd, Pb and Zn by 19 wetland plant species in constructed wetland. *J. Hazard. Mater*. 147: 947 – 953.
127. Liu X, Yang C, Zhang L, Li L, Liu S, Yu J, Wu, H. (2011). Metabolic profiling of cadmium-induced effects in one pioneer intertidal halophyte *Suaeda salsa* by NMR-based metabolomics. *Ecotoxicology*. 20(6), 1422-1431.
128. López – Flores R, Quintana XD, Salvadó V, Hidalgo M., Sala L, Moreno – Amich M. (2003) Comparison of nutrient and contaminant fluxes in two areas with different hydrological regimes (Empordà Wetlands, NE Spain). *Water Res*. 37: 3034-3046.
129. López-Errasquín E, Vázquez C. Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. *Chemosphere*. 2003; 50, 137-143.
130. Lux A, Martinka M, Vaculík M, White PJ. (2011). Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *J. Exp Bot*. 62(1): 21-37.
131. Ma ZY, Pu SC, Jiang JJ, Huang B, Fan MZ, Li ZZ (2011) A novel thermostable phytase from the fungus *Aspergillus aculeatus* RCEF 4894: gene cloning and expression in *Pichia pastoris*. *World J Microbiol Biotechnol*. 27(3): 679-686.

132. Ma, F., Wu, J., Wang, L., Yang, J., Li, S., Li, Z., & Zhag, X. (2014). Characterization of the microbial community in the rhizosphere of *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex. Steudel growing in the Sun island wetland. *Water Environ Res.* 86(3): 258-268.
133. Madera y Bosques vol.15 no.3 Xalapa Jan. 2009 (<http://www.scielo.org.mx>)
134. Mainstone CP, Parr W. (2002). Phosphorus in rivers—ecology and management. *Sci Total Environ.* 282: 25-47.
135. Maliha R, Samina K, Najma A, Sadia A, Farooq L. (2004). Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pak J Biol Sci*
136. Malik A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.* 30: 261-278.
137. Marchand L, Mench M, Jacob, DL, Otte ML, (2010). Metal and metalloid removal in constructed wetlands, with emphasis on the importance of plants and standardized measurements: a review. *Environ. Pollut.* 158, 3447–3461.
138. Marra LM, Oliveira-Longatti SMD, Soares CR, Lima JMD, Olivares FL, Moreira F. (2015). Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. *Brazil J Microbiol.* 46(2): 367-375.
139. Marschner P, Crowley D, Rengel Z. (2011). Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis—model and research methods. *Soil Biol Biochem.* 43(5): 883-894.
140. Method 7000A, Atomic Absorption Methods. Environmental Protection Agency (EPA). 1992.
141. Meharg AA. (2003). The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations. *Mycol Res.* 107(11): 1253-1265.
142. Milone MT, Sgherri C, Clijsters H, Navari-Izzo F. (2003). Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environ Exp Bot.* 50(3): 265-276.
143. Miller SP, Sharitz RR. (2000). Manipulation of flooding and arbuscular mycorrhiza formation influences growth and nutrition of two semiaquatic grass species. *Func Ecol.* 14(6): 738-748.

144. Mitsch WJ, Horne AJ, Nairn R W. (2000). Nitrogen and phosphorus retention in wetlands-ecological approaches to solving excess nutrient problems. *Ecol Eng.* 14(1-2): 1-7.
145. Modaihsh A, Al-Swailem M, Mahjoub M. (2004). Heavy metal contents of commercial inorganic fertilizer used in the Kingdom of Saudi Arabia. *Agri Mar Sci* 9: 21-25.
146. Mohamed DJ, Martiny JB. (2011). Patterns of fungal diversity and composition along a salinity gradient. *The ISME Journal.* 5(3): 379-388.
147. Morales A, Alvear M, Valenzuela E, Castillo CG, Borie F (2011) Screening, evaluation and selection of phosphate-solubilizing fungi as potential biofertilizer. *J Soil Sci Plant Nutr.* 11(4): 89-103.
148. Muhammad A, Xu J, Li Z, Wang H, Yao H (2005) Effects of lead and cadmium nitrate on biomass and substrate utilization pattern of soil microbial communities. *Chemosphere* 60(4): 508-514.
149. Muñoz AJ, Ruiz E, Abriouel H, Gálvez A, Ezzouhri L, Lairini K, Espínola F. (2012) Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewaters: Identification and evaluation of its potential for biosorption. *Chem Eng J.* 210: 325 – 332.
150. Mycobank, Fungal databases nomenclature and species Banks. [2015 Jan 15] Available from: [http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr\\_=459818](http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr_=459818)
151. Nahas E (2007) Phosphate solubilizing microorganisms In: Velázquez E, Rodríguez-Barrueco C (eds.) Effect of carbon, nitrogen, and phosphorus sources. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, Salamanca, Spain. pp. 111-115.
152. Naik SK, Maurya S, Kumar R, Sadhna K, Gagrai S, Das B, Kumar S and Bhatt BP (2013) Inorganic phosphate solubilization by phosphate solubilizing fungi isolated from acidic soils. *Afr J Microbial Res.* 7 (34): 4310 – 4316.

153. National Center for Biotechnology Information. [2015 Jan 15] Available from: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).
154. Ning J. (2000). Mycorrhizal roles in broomsedge plants under phosphorus limitation and aluminum toxicity. PhD dissertation, West Virginia University, Morgantown WV, USA
155. Oliveira RS, Dodd JC, Castro PML. (2001). The mycorrhizal status of *Phragmites australis* in several polluted soils and sediments of an industrialised region of Northern Portugal. *Mycorrhiza*. 10(5): 241-247.
156. Oliveira CA, Alves VMC, Marriel IE, Gomes EA, Scotti MR, Carneiro NP, Sa NMH. (2009). Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biol Biochem*. 41(9): 1782-1787.
157. Onthong J, Gimsanguan S, Pengnoo A, Nilnond C, Osaki M. (2007). Effect of pH and some cations on activity of acid phosphatase secreted from *Ustilago sp.* isolated from acid sulphate soil. *Songklanakarin J Sci Technol*. 29: 275-286.
158. Ortega-Larrocea MP, Xoconostle-Cázares B, Maldonado-Mendoza IE, Carrillo-González R, Hernández-Hernández J, Díaz Garduño M, López-Meyer M, Gómez-Flores L, González -Chávez MC. (2010). Plant and fungal biodiversity from metal mine wastes under remediation at Zimapan, Hidalgo, Mexico. *Environ Pollut*. 158: 1922-1931
159. Pandey A, Das N, Kumar B, Rinu K, Trivedi P. (2008) Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. isolated from soil samples of Indian Himalayan region. *World J Microbiol Biotechnol*. 24(1): 97-102.
160. Papoyan A, Pineros M, Kochian LV. (2007). Plant Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> status effects on root and shoot heavy metal accumulation in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol*. 175: 51-58.
161. Park S, Bae W. (2009). Modeling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid. *Process Biochem*. 44(6): 631-640.

162. Parniske M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol.* 6(10): 763-775.
163. Pérez A F, De la Ossa J L y Montes D 2012 Hongos solubilizadores de fosfatos en fincas ganaderas del departamento de Sucre. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 4(1):35-45.  
<http://www.recia.edu.co/documentosrecia/vol4num1/originales/3-ORIGINAL-3-04-01-2012-HONGOS-COLONIZA.pdf>
164. Persello-Cartieaux F, Nussaume L, Robaglia C. (2003). Tales from the underground: molecular. *Plant Cell Environ.* 26 (2): 189-199.
165. Piceno YM, Lovell CR (2000). Stability in natural bacterial communities: I. Nutrient addition effects on rhizosphere diazotroph assemblage composition. *Microbial Ecol.* 39(1): 32-40.
166. Pikovskaya RI (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya.* 17: 362–370.
167. Pinho S, Ladeira B. (2012). Phytotoxicity by lead as heavy metal focus on oxidative stress. *J Bot.* 1
168. Posada RH, Heredia-Abarca G, Sieverding E, Sánchez de Prager M. (2013) Solubilization of iron and calcium phosphates by soil fungi isolated from coffee plantations. *Arch Agron Soil Sci.* 59(2): 185-196.
169. Pradhan N, Sukla LB (2005) Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *Afr J Biotechnol.* 5(10): 850-854.
170. Price MS, Classen JJ, Payne GA. (2001). *Aspergillus niger* absorbs copper and zinc from swine wastewater. *Bioresour Technol.* 77: 41 – 49.
171. Rafati M, Khorasani N, Moattar F, Shirvany A, Moraghebi F, Hosseinzadeh S. (2011). Phytoremediation potential of *Populus alba* and *Morus alba* for cadmium, chromium and nickel absorption from polluted soil. *Int J Environ Sci Tech Res.* 5: 961–970.
172. Rashid M, Khalil S, Ayub N, Alam S, Latif F (2004) Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro* conditions. *Pak J Biol Sci.* 7(2): 187–196.

173. Rasool A, Irum S. (2014). Toxic Metal Effect on Filamentous Fungi Isolated from the Contaminated Soil of Multan and Gujranwala. *J Bioresource Manage.* 1(2): 38 - 51.
174. Reboreda R, Caçador I. (2007). Halophyte vegetation influences in salt marsh retention capacity for heavy metals. *Environ Pollut.* 146: 147- 154.
175. Renella G, Ortigoza AR, Landi L, Nannipieri P. (2003). Additive effects of copper and zinc on cadmium toxicity on phosphatase activities and ATP content of soil as estimated by the ecological dose (ED 50). *Soil Biol Biochem.* 35(9): 1203-1210.
176. Rezaie H, Sahlezadeh M (2014) Performance removal nitrate and phosphate from treated municipal wastewater using *Phragmites australis* and *Typha latifolia* aquatic plants. *J Civil Eng Urban* 4(3): 315-321.
177. Rice D, Rooth J. (2000). Colonization and expansion of *Phragmites australis* in upper Chesapeake Bay tidal marshes. *Wetlands.* 20(2): 280-299.
178. Rinu K, Pandey A. (2010). Temperature-dependent phosphate solubilization by cold-and pH-tolerant species of *Aspergillus* isolated from Himalayan soil. *Mycoscience*, 51(4): 263-271.
179. Rudresh DL, Shivaprakash MK, Prasad RD (2005) Tricalcium phosphate solubilizing abilities of *Trichoderma* sp. in relation of P uptake and growth and yield parameters of chickpea (*Cicerarietinum* L.). *Can J Microbiol.* 51(3): 217-222.
180. Sabiha-Javied, Mehmood T, Tufai M, Irfan N. (2009). Heavy metal pollution from phosphate rock used for the production of fertilizer in Pakistan. *Microchem. J.* 91: 94-99.
181. Sadzawka, A., Carrasco, M. A., Grez, R., Mora, M. L., Flores, H., Neaman, A. (2004). Métodos de análisis recomendados para los suelos chilenos. *Comisión de Normalización y Acreditación. Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo, Santiago, Chile.*
182. Saltonstall K. (2002). Cryptic invasion by a non-native genotype of the common reed, *Phragmites australis*, into North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4): 2445-2449.

183. Samecka-Cymerman A, Kempers AJ. (2001). Concentrations of heavy metals and plant nutrients in water, sediments and aquatic macrophytes of anthropogenic lakes (former open cut brown coal mines) differing in stage of acidification. *Sci Total Environ*; 281(1-3): 87-98.
184. Sauer M, Porro D, Mattanovich D, Branduardi P. (2008). Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol.* 26(2): 100-108.
185. Sashidhar B, Podile AR (2010). Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *J App Microbiol.* 109(1): 1-12.
186. Saxena J, Basu P, Jaligam V, Chandra S (2013) Phosphate solubilization by a few fungal strains belonging to the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *Afr J Microbiol Res.* 7 (41): 4862 – 4869.
187. Scervino JM, Mesa MP, Della Mónica I, Recchi M, Moreno NS, Godeas A. (2010). Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. *Biol. Fertil. Soils.* 46(1): 755–763.
188. Scervino JM, Papinutti VL, Godoy MS, Rodriguez MA, Della Mónica I, Recchi M, Pettinari MJ, Godeas AM. (2011). Medium pH, carbon and nitrogen concentrations modulate the phosphate solubilization efficiency of *Penicillium purpurogenum* through organic acid production. *J Appl Microbiol* 110: 1215–1223.
189. Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold DL, Polle A. (2001). Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiol.* 127(3): 887-898.
190. Sekara A, Poniedzialek M, Ciura J, Jedrzczyk E. (2005). Cadmium and lead accumulation and distribution in the organs of nine crops: implications for phytoremediation. *Pol J Environ Stud.* 14(4): 509-516.
191. Sharma, P., & Dubey, R. S. (2005). Lead toxicity in plants. *Brazil J Plant Physiol.* 17(1): 35-52.

192. Sharma SB, Sayyed R, Trivedi MH, Gobi TA (2013) Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus* 2: 587-591.
193. Sharpley, A.N. and H. Tunney. (2000) Phosphorus research strategies to meet agricultural and environmental challenges of the 21st century. *J Environ Qual.* 29:176-181.
194. Sheoran AS, Sheoran V (2006). Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: A critical review. *Miners Eng.* 19(2): 105-116.
195. Silva Filho GN, Vidor C. (2001). Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. *Pesqui Agropecu Bras.* 36(12): 1495-1508.
196. Singh P, Cameotra SS. (2004). Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. *Biochem Bioph Res Co.* 319(2): 291-297.
197. Singh N, Srivastava JK. (2007). Comparison of the ability of two grasses viz., *Phragmites karka* (Retz.) Trin. ex. Steud and *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash to improve surface water quality in a constructed wetland. *Int J Water.* 3(3): 266-274.
198. Singh D, Tiwari A, Gupta R. (2012). Phytoremediation of lead from wastewater using aquatic plants. *J Agric Technol.* 8(1): 1-11.
199. Solis-Dominguez FA. (2007). Acumulación de cadmio en *Echinochloa polystachya* asociada a *Glomus mosseae* BEG25 y *Pseudomonas fluorescens* 2-4. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.
200. Souchie EL, Azcón R, Barea JM, Saggin-Júnior OJ, Silva EMRD. (2006). Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesqui Agropecu Bras.* 41(9):1405-1411.
201. Soukup A, Votrubová O, Čížková H. (2002). Development of anatomical structure of roots of *Phragmites australis*. *New Phytol.* 153(2): 277-287.
202. Southichak B, Nakano K, Nomura M, Chiba N, Nishimura O. (2006). *Phragmites australis*: A novel biosorbent for the removal of heavy metals from aqueous solution. *Water Res.* 40(12): 2295-2302.

203. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. American Public Health Association APHA, Washington, DC. 2005.
204. Statistical Analysis System Software, SAS/STAT [CD-ROM]. Version 9.4. North Carolina, USA. 2013.
205. Stoltz, E., Gregor, M., 2002. Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing in submerged mine tailings. *Environ Exp Bot.* 47: 271 – 280.
206. Stottmeister U, Wiessner A, Kuschik P, Kappelmeyer U, Kastner M, Bederski O, Muller RA, Moormann H (2003) Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnol Adv.* 22 (1): 93–117.
207. Stutz JC, Morton JB. (1996). Successive pot cultures reveal high species richness of arbuscular endomycorrhizal fungi in arid ecosystems. *Can J Bot.* 74(12): 1883-1889.
208. Sundareshwar, P.V., Morris, J.T., Koepfler, E.K., Fornwalt, B., 2003. Phosphorus limitation of coastal ecosystem processes. *Science.* 299: 563–565.
209. Swearingen J, Saltonstall K. *Phragmites* Field Guide: Distinguishing Native and Exotic Forms of Common Reed (*Phragmites australis*) in the United States. Plant Conservation Alliance, Weeds Gone Wild. (2010). <http://www.nps.gov/plants/alien/pubs/index.htm>.
210. Tabatabai MA, Bremner JM. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol Biochem.* 1(4): 301-307.
211. Tabatabai MA. (1982). Soil enzymes. *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, (methodsofsoilan2): 903-947.
212. Tanaka A, Christensen MJ, Takemoto D, Park P, Scott B (2006) Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial rye grass mutualistic association. *Plant Cell.* 18(4): 1052–1066.
213. The Index Fungorum. [2015 Jan 15] Available from: [www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org).
214. Toal ME, Yeomans C, Killham K, Meharg AA. (2000). A review of rhizosphere carbon flow modelling. *Plant Soil.* 222(1): 263-281.

215. Tuason MM, Arocena JM (2009) Calcium oxalate biomineralization by *Piloderma fallax* in response to various levels of calcium and phosphorus. *Appl Environ Microbiol.* 72(22): 7079-7085.
216. Umezawa Y, Hosono T, Ondear SI, Siringan F, Buapeng S, Delinom R, Yoshimizu C, Tayasu I, Nagata T, Taniguchi M. (2008) Sources of nitrate and ammonium contamination in groundwater under developing Asian megacities. *Sci Total Environ.* 404: 361 – 376
217. Unamuno VIR, De Visscher A, Lesage E, Meers E, Leuridan I, Tack FMG. (2007). Cu sorption on *Phragmites australis* leaf and stem litter: A kinetic study. *Chemosphere.* 69(7), 1136-1143.
218. U.S. Environmental Protection Agency. Clean Water Act, sec. 503, vol. 58, no. 32. Washington, DC. 1993.
219. Vacca G, Wand H, Nikolausz M, Kusch P, Kastner M. (2005). Effect of plants and filter materials on bacteria removal in pilot-scale constructed wetlands. *Water Res.* 39:1361-1373.
- 220.
221. Valix M, Usai F, Malik R. (2001). Fungal bioleaching of low grade lateritic ores. *Miner Eng.* 14(2): 197.
222. Valix M, Tang JY, Cheung WH. (2001). The Effects of Mineralogy on the Biological leaching of nickel laterite ores. *Miner Eng.* 14(12): 1629.
223. Valix M, Loon LO. (2003) Adaptive tolerance behavior of fungi in heavy metals. *Miner Eng.* 16: 193–198
224. Vassilev, N., Vassileva, M., & Nikolaeva, I. (2006). Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *App. Microbiol Biotechnol.* 71(2): 137-144.
225. Vazquez P, Holguin G, Puente ME, Lopez-Cortes A, Bashan Y (2000) Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol Fert Soils.* 30: 460–468.

226. Verma S, Dubey R.S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci.* 164: 645 – 655.
227. Vig K, Megharaj M, Sethunathan N, Naidu R (2003) Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. *Adv Environ Res.* 8(1): 121–135.
228. Vymazal J (2007) Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Sci Total Environ.* 380: 48–65.
229. Wakelin SA, Warren RA, Harvey PR, Ryder MH. (2004). Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biol Fert Soil.* 40(1). 36-43.
230. Walpola BC, Yoon M (2013) In vitro solubilization of inorganic phosphates by phosphate solubilizing microorganisms. *Afr J Microbiol Res.* 7(27): 3534-3541.
231. Wang Z, Dong J, Liu L, Zhu G, Liu, C. (2013). Screening of phosphate-removing substrates for use in constructed wetlands treating swine wastewater. *Ecol Eng.* 54: 57-65.
232. Weber KP, Gehder M, Legge RL. (2008) Assessment of changes in the microbial community of constructed wetland mesocosms in response to acid mine drainage exposure. *Water Res.* 42 (1–2): 180–188
233. Weis JS, Weis P. (2004). Metal uptake, transport, and release by wetland plants: Implications for phytoremediation and restoration. *Environ Int.* 30: 685-700.
234. Weller DM, Raaijmakers JM, Gardener BBM, Thomashow LS (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 40(1): 309-348.
235. Wetzel R. (2001). Fundamental processes within natural and constructed wetland ecosystems: short-term versus long-term objectives. *Water Sci Technol,* 44(11-12): 11-12.
236. Williams JB. (2002) Phytoremediation in Wetland Ecosystems: Progress, Problems, and Potential. *Crit Rev Plant Sci.* 21(6): 607–635

237. Windham L, Weis J, Weis P, 2003. Uptake and distribution of metals in two dominant salt marsh macrophytes, *Spartina alterniflora* (cordgrass) and *Phragmites australis* (common reed). *Estuar Coast Shelf S.* 56: 63–72.
238. Wuana, R.A., Okieimen, F.E., 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology* 1–20.
239. Xu X, Huang Q, Gu JD, Chen W (2012) Biosorption of cadmium by metal-resistant filamentous fungus isolated from chicken manure compost. *Environ Technol.* 33(13-15): 1661-1670.
240. Yang T, Poovaiah BW. (2002). Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 4097-4102.
241. Yang J, Chen L, Liu LZ, Shi WL, Meng XZ. (2014). Comprehensive risk assessment of heavy metals in lake sediment from public parks in Shanghai. *Ecotoxicol Environ Saf.* 102: 129-135.
242. Yasser MM, Mousa AS, Massoud ON, Nasr SH. (2014). Solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing fungi isolated from Egyptian soils. *J Biol Earth Sci.* 4(1): B83-B90.
243. Yoon J, Cao X, Zhou O, Ma LQ (2006) Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Sci Total Environ.* 368: 456–464.
244. Zafar SF, Aqil F, Ahmad I (2007) Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Biores Technol.* 98(13): 2557-2561.
245. Zouboulis AI, Loukidou MX, Matis KA. (2004) Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. *Process Biochem.* 39: 909-916.

Artículo Aceptado

*Chemistry and Ecology*, 2015

<http://dx.doi.org/10.1080/02757540.2015.1111876>

***In vitro* toxic effects of heavy metals on fungal growth and phosphate-solubilising abilities of isolates obtained from *Phragmites australis* rhizosphere**

José Roberto Zúñiga-Silva<sup>a</sup>, Wilberth Chan-Cupul<sup>b</sup>, Octavio Loera-Corral<sup>c</sup>, Ricardo Aguilar-López<sup>a</sup>, Beatriz Xoconostle-Cázares<sup>a</sup> and Refugio Rodríguez Vázquez<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico; <sup>b</sup>Laboratorio de Fitopatología y Micología Aplicada, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, Tecoman, Mexico; <sup>c</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City, Mexico

(Received 28 April 2015; accepted 19 October 2015 )