



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“RIESGO DE ACUMULACIÓN DE METALES PESADOS POR
Prosopis laevigata, ESPECIE FORRAJERA”

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

ELODIA RODRÍGUEZ GALINDO

DIRECTOR:

DR JUAN OROZCO VILLAFUERTE

ASESOR:

DRA LETICIA BUENDÍA GONZÁLEZ



TOLUCA, MÉXICO

SEPTIEMBRE, 2016

Índice general

Resumen.....	3
1. Introducción.....	4
2. Antecedentes.....	7
2.1 Contaminación por metales pesados.....	7
2.2 Zonas contaminadas por metales pesados.....	8
2.3 Efectos de los metales pesados en el medioambiente y la salud humana.....	9
2.4 Tecnologías de remediación de metales pesados.....	13
2.4.1 Fitorremediación.....	14
2.4.2 Aplicación del cultivo <i>in vitro</i> en la fitorremediación.....	16
2.5 <i>Prosopis laevigata</i>	18
2.5.1 Descripción Botánica de <i>Prosopis laevigata</i>	18
2.5.2 Distribución de <i>Prosopis laevigata</i>	19
2.5.3 Usos de <i>Prosopis laevigata</i>	19
2.5.4 Estudios de fitorremediación en <i>P. laevigata</i>	20
3. Justificación.....	22
4. Hipótesis.....	23
5. Objetivos.....	24
5.1 Objetivo general.....	24
5.2 Objetivos particulares.....	24
6. Metodología.....	25
6.1 Material vegetal.....	26
6.1.1 Cultivos <i>in vitro</i> de <i>P. laevigata</i>	26
6.2 Determinación de los parámetros de tolerancia.....	27
6.3 Análisis del contenido de metales en los tejidos vegetales y determinación de parámetros de bioconcentración.....	27
6.4 Análisis estadístico.....	28
7. Resultados y discusión.....	29
7.1 Germinación y sobrevivencia de <i>P. laevigata</i>	29
7.2 Crecimiento y desarrollo.....	31
7.3 Parámetros de tolerancia.....	32
7.4 Acumulación de metales en los tejidos de <i>P. laevigata</i>	35
7.5 Parámetros de bioconcentración.....	39
8. Conclusiones.....	44
9. Perspectivas.....	45
10. Agradecimientos.....	46
11. Referencias bibliográficas.....	47
12. Constancias y anexos.....	55

Resumen

Prosopis laevigata es una especie forrajera, que se ha reconocido como acumuladora de metales pesados (MP), entre ellos Pb, Cr, Ni y Cd, sin embargo, los estudios se han realizado en forma individual para cada MP. El objetivo de este estudio fue determinar el contenido y número de metales pesados (MP) que puede bioacumular *P. laevigata*, creciendo en medios artificialmente contaminados por MP de forma simultánea. Semillas de *P. laevigata* se cultivaron asépticamente durante 50 días en medio de cultivo Murashige & Skoog suplementado con 50 mg/L de Pb, Cr, Ni y Cd de forma individual, así como en mezclas de 2, 3 y 4 metales, bajo la misma concentración. Los datos obtenidos mostraron que las semillas de *P. laevigata*, fueron capaces de germinar bajo todos los tratamientos evaluados, mientras que el crecimiento y la sobrevivencia disminuyeron al incrementar el número de MP incluidos en el medio de cultivo. El contenido de agua fue menor en los tratamientos evaluados, comparados con el tratamiento control. El índice de tolerancia (IT) solo fue significativamente menor en las plántulas expuestas a PbCdNi (0.16), mientras que los otros tratamientos tuvieron igual o menor IT que el control, destacando el tratamiento conteniendo Pb con el significativamente mayor IT (0.85). Respecto a la acumulación de metales en los tejidos, en general, se observó mayor acumulación en raíces que en tallos, siendo Pb y Ni, los metales que presentaron mayor bioacumulación en los tallos (785 mg/kg de Pb y 734 mg/kg de Ni); para el caso de las raíces, Cr fue el metal significativamente mayor acumulado (6898 mg/kg de Cr). Por otro lado, en el factor de bioacumulación determinado, cuando solo se encontraba un MP en el medio de cultivo, el Pb mostró los mayores valores (FB=15.71), y al incrementar el número de MP, el Ni mostró valores de FB=20.7. Por otro lado, el Cd es el metal con mayor capacidad de translocarse de la raíz a la parte aérea cuando solo está presente un MP (FT=0.55), y al incrementar el número de MP, el Ni fue el MP con mayor FT (0.96). *P. laevigata* puede ser considerada como potencial hiperacumuladora de más de un MP y al ser consumida por el ganado, podría significar un riesgo para la salud humana.

Capítulo 1

Introducción

Los suelos, especialmente los que se encuentran cerca de zonas metalíferas, plantas de moldeo de metales y tratamiento de residuos, están fuertemente contaminados con metales pesados (MP), incluyendo el cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), plomo (Pb) y zinc (Zn) (Boularaba, *et al.*, 2006). Los metales pesados son altamente tóxicos para los seres vivos y en general para el medio ambiente, su toxicidad es influenciada por los factores medioambientales así como por la presencia de otros metales (Moutschen, 1985).

La contaminación del suelo con metales pesados es un grave problema ambiental global que presenta riesgos para humanos, animales, microbios y plantas. La contaminación de los suelos agronómicos con metales pesados y su impacto negativo en los sistemas agrícolas son, por tanto, actualmente el foco de atención por parte de los ambientalistas de todo el mundo. Esto se debe a que el suelo es un sistema activo y dinámico donde muchas actividades químicas, físicas y biológicas están ocurriendo constantemente (Ademorati, 1996).

Muchos metales pesados son potenciales carcinogénicos (Kim, *et al.*, 2009) y pueden causar disfunción y daño de órganos. El departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU. (2011), la Organización Mundial de la Salud, el Centro Internacional de Investigación de Cáncer (2012), USEPA / IRIS (2012) y California EPA (2011) han declarado arsénico (As), Cd, Cr, níquel (Ni) y Pb como cancerígenos humanos. Los efectos toxicológicos a los seres humanos por el consumo de alimentos contaminados con metal se basan en varios factores, incluyendo formas químicas de los metales pesados, dosis, vía de exposición, tiempo, frecuencia, la edad, el género, la fuente nutricional y biológica de la especie (Caussy, *et al.*, 2003).

Debido a los efectos en el medio ambiente y a la salud humana, es importante sumar esfuerzos para la recuperación de las zonas contaminadas. Los métodos fisicoquímicos

empleados para la remediación de suelos contaminados con metales pesados, tales como el lavado, la remoción, transporte y entierro, son técnicas costosas y que pueden generar severos disturbios en el medioambiente. Uno de los tratamientos para la remediación de suelos contaminados por metales pesados incluye la fitorremediación, que es el uso de plantas para restaurar o estabilizar sitios contaminados, y aprovecha las habilidades naturales de las plantas para acumular, estabilizar y/o degradar sustancias orgánicas e inorgánicas. En general, la fitorremediación es más apropiada para sitios contaminados poco profundos, utilizando especies vegetales nativas aclimatadas al lugar y a las condiciones ambientales. El uso de la vegetación en sitios contaminados reduce la exposición de los humanos a la inhalación directa del aire contaminado por metales (Schnoor, *et al.*, 1995). Esta estrategia incluye mecanismos para la fitorremediación de suelos como la fitoextracción y la fitoestabilización.

La fitorremediación ha tenido impacto en la recuperación de zonas contaminadas, sin embargo, uno de los problemas de la técnica es identificar especies con alta capacidad para tolerar, crecer y/o bioacumular varios metales, ya que generalmente, las zonas contaminadas presentan más de un metal en alta concentración.

De acuerdo a la NOM-147-SEMARNAT-SSA1-2004, las vías de exposición- proceso por el cual el contaminante entra en contacto directo con el organismo receptor- pueden ser:

- a. Ingestión: los contaminantes ingresan al organismo por vía oral, e.g. la ingesta accidental o habitual de suelo por niños.
- b. Inhalación: los contaminantes ingresan al organismo por las vías respiratorias, e.g. respirar aire con polvo proveniente de un suelo contaminado.
- c. Contacto dérmico: los contaminantes ingresan al organismo a través de la piel, e.g. por contacto constante y prolongado con aguas contaminadas.

Adicionalmente, hay un riesgo a la salud humana por consumo de vegetales locales, cultivos de tubérculos y forrajes creciendo en suelos contaminados. En muchos países, y México no es la excepción, los ganaderos emplean extensas zonas de praderas naturales para la crianza de sus animales y cada vez son mayores debido a los cambios de hábitos alimenticios en la población al adquirir valores occidentales en todo el mundo, las personas consumen más carne y lácteos que en el pasado. Éstas áreas de pastoreo intenso, actualmente incluyen numerosas zonas contaminadas donde se han determinado altos

niveles de diversos metales tóxicos (Cu, Cd, Cr, Zn, hierro (Fe), Ni, manganeso (Mn) y Pb), en dichas áreas se encuentran creciendo y desarrollando numerosas especies silvestres donde las partes comestibles como frutos, semillas, hojas y ramas son consumidas por el ganado. Existen reportes de especies vegetales que pueden acumular metales pesados creciendo en zonas contaminadas y por ello exista el riesgo latente de la contaminación de la cadena alimentaria. El proceso de absorción y acumulación de los metales por diferentes plantas, depende de la concentración, tipo y número de metales presentes, disponibilidad y solubilidad en el suelo y de las especies vegetales creciendo en estos suelos (Volke-Sepúlveda, et al., 2005). *Prosopis laevigata* (mezquite), es una especie vegetal que se ha reportado como acumuladora de metales pesados (Cr, Pb, Cd y Ni) de manera individualizada en cultivos *in vitro* (Buendía-González *et al.* 2010 a, b).

Capítulo 2

Antecedentes

2.1 Contaminación por metales pesados

La contaminación del ambiente se produce por la incorporación de cualquier tipo de energía, organismo o sustancia, que afecta las características de los ecosistemas, modificando negativamente sus propiedades y su capacidad para asimilarlas o degradarlas. Su entrada se realiza como consecuencia de las actividades antropogénicas, aunque también se puede producir de forma natural (Delgadillo-López, *et al.*, 2011).

Las industrias especializadas en el proceso de metales (siderurgias y metalúrgicas) pueden emitir partículas de dimensiones micrométricas, que son fácilmente transportables por el viento a grandes distancias y causar problemas en la salud de poblaciones (Csuros & Csuros, 2002). Los metales pesados son aquellos elementos químicos que presentan una densidad igual o superior a 5 g/cm^3 cuando están en forma elemental o cuyo número atómico es superior a 20 (Volke, *et al.*, 2004).

México es uno de los países de Latinoamérica que se encuentra localizado en una región volcánica rica en minerales. La tradición minera en el país se remonta a la época prehispánica, con la explotación de yacimientos ubicados principalmente en las zonas de Taxco, Pachuca, Guanajuato, San Luis Potosí, Zacatecas, Estado de México y Querétaro. El ejemplo más común de la contaminación de suelos por actividades mineras en México es la generada durante el beneficio del oro y la plata, realizado comúnmente por amalgamación con Hg y por cianuración. En ninguno de los dos casos, es posible la recuperación total de los compuestos y/o elementos adicionados, por lo que es común encontrarlos en los residuos del proceso (jales) en forma soluble (Gutiérrez, 2003).

Otra fuente importante de contaminación por elementos potencialmente tóxicos en México es la actividad industrial. Desde el inicio de la industrialización y hasta la actualidad, este

tipo de actividades genera diversos tipos de residuos peligrosos que, ante la falta de una regulación jurídica adecuada que los identificara como tales, se dispusieron en sitios inadecuados como terrenos aledaños a las plantas industriales especialmente adquiridos para ese propósito, patios de las propias instalaciones industriales o bien, se depositaron indiscriminadamente en barrancas, ríos, basureros, terrenos baldíos y cañadas, entre otros (SEMARNAT, 2004).

Algunas otras fuentes, subestimadas, que generan la contaminación por metales y metaloides son (Csuros & Csuros, 2002):

- Drenaje pluvial: en muchas ocasiones el drenaje pluvial de las ciudades puede contener muchos metales, dependiendo del tipo de camino y material de construcción de los mismos, de la cantidad de tráfico, planeación urbanista y uso de suelo.
- Descargas y drenajes industriales: actualmente en México, existe normatividad que regula las descargas de industrias; sin embargo, ciertas industrias pueden generar residuos con concentraciones mayores de metales por las características de sus procesos.
- Drenaje doméstico: transporta metales desechados por el metabolismo y lixiviados de los materiales de construcción de las tuberías (Cu, Pb, Zn, Cd, Fe, Mn, Cr, Ni, Co, Bo y As). Los tratamientos convencionales para aguas residuales, remueven hasta 50% de los metales contenidos, dejando una carga considerable de metales en el agua tratada, además de concentrar los metales removidos en los lodos de tratamiento.
- Rellenos sanitarios: el lixiviado que se produce en los rellenos sanitarios normalmente contiene metales como Cu, Zn, Pb y Hg.
- Quema de combustibles fósiles: es la principal fuente de metales hacia la atmósfera y fuente potencial de contaminación de cuerpos superficiales de agua.

2.2. Zonas contaminadas por metales pesados

Debido al procesamiento de los recursos minerales, se han generado grandes cantidades de residuos sólidos, líquidos y gaseosos que han ocasionado una gran cantidad de sitios contaminados a lo largo de todo el país. Un ejemplo se encuentra en el estado de Morelos en donde, por varias décadas, se explotó principalmente plata (Ag), Pb y Zn. Los distritos

mineros más explotados en el estado, por sus contenidos de minerales metálicos, se ubican en el municipio de Tlaquiltenango. Un ejemplo más particular de esta problemática, se encuentra en la comunidad de Huautla, en donde, además de la riqueza natural en minerales azufrados de Pb y Ag en la zona, como consecuencia de la actividad minera, se estima que existen alrededor de 780 mil toneladas de residuos (SEMARNAP, 2000), en los cuales el principal contaminante es el plomo, además de otra cantidad de material no procesado rico en Pb, Cd y Mn. Estos materiales se encuentran dispuestos a la intemperie y al borde de una serie de pequeños arroyos que forman el *Arrollo Grande* que desemboca en el Río Amacuzac (Velasco, *et al.*, 2004).

México tiene una larga historia minera, por lo que existen numerosos sitios contaminados por esta actividad (Tabla 1), Nuevo León y Coahuila son dos de los estados de la República Mexicana con mayor número de sitios con residuos provenientes de actividades minerales, contaminando con escorias de fundición, aluminio, Pb, Cd, Ni, cianuros, jales y metales pesados.

Algunos otros ejemplos de casos de contaminación por metales en México, son: (i) Pb en Torreón, Coahuila; (ii) Cr en Tultitlán, Estado de México; (iii) jales mineros (conteniendo diferentes metales) en una gran cantidad de distritos mineros en diferentes estados de la República, como son Baja California Sur, Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, México, Morelos, Nayarit, Nuevo León, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas, entre algunos otros (Velasco, *et al.*, 2004).

2.3 Efectos de los metales pesados en el ambiente y la salud humana

El impacto ambiental causado por la contaminación por metales, depende de la capacidad de acomplejamiento de estos con el suelo y agua, así como de las condiciones fisicoquímicas y biológicas del entorno, los cuales pueden cambiar el estado de oxidación de los metales. El cambio de estado de oxidación y el pH pueden incrementar o disminuir el riesgo potencial de biodisponibilidad de un metal en el suelo (USEPA, 2001). En el caso particular de los suelos, si los metales se encuentran biodisponibles, pueden afectar la fertilidad y/o uso posterior de los mismos (Volke, *et al.*, 2004).

Tabla 1. Sitios abandonados e ilegales, contaminados con residuos peligrosos generados por la industria minera.

Estado ^a	Principales residuos provenientes de actividades mineras ^b	No. de sitios
Baja California	Metales pesados, polvo de fundición	8
Baja California Sur	Jales, escorias de fundición	2
Coahuila	Metales pesados, jales	15
Guanajuato	Metales pesados, escorias de fundición	10
Hidalgo	Escorias de fundición	6
Jalisco	Tierras de blanqueo, residuos de baterías	7
México	Escorias de fundición	10
Nayarit	Jales	5
Nuevo León	Escorias de fundición, aluminio, plomo, cadmio, níquel, cianuros	22
San Luis Potosí	Escorias de fundición, níquel	10
Tamaulipas	Escorias de fundición	8
Veracruz	Azufre	8
Zacatecas	Jales, metales pesados	9

^a Solamente se mencionan los estados en los que se han identificado sitios contaminados con residuos mineros

^b Solamente se mencionan los residuos generados por la industria minera

Fuente: Semarnat/PROFEPA. Informe Trianual, 1995-1997, México, 1998.

Los suelos que quedan tras una explotación minera contienen todo tipo de materiales residuales, escombros estériles, entre otros, lo que representa graves problemas para el desarrollo de la cubierta vegetal, las características afectadas más notables son las siguientes: clase textural desequilibrada, ausencia o baja presencia de la estructura edáfica, propiedades químicas anómalas, disminución o desequilibrio en el contenido de nutrientes fundamentales, ruptura de los ciclos biogeoquímicos, baja profundidad efectiva, dificultad de enraizamiento, baja capacidad de cambio, baja retención de agua y presencia de compuestos tóxicos (García & Dorronsoro, 2002).

Dentro de los metales pesados, los denominados oligoelementos, y que pueden servir como micronutrientes para los cultivos, ya que son requeridos en pequeñas cantidades y son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital. Pasado cierto umbral se vuelven tóxicos. Como el boro (B), cobalto (Co), Cr, Cu, molibdeno (Mo), Ni, Fe, selenio (Se) y Zn y el metaloide As. También hay metales pesados sin función biológica conocida, cuya presencia en determinadas cantidades en seres vivos provoca disfunciones en el funcionamiento de sus organismos. Resultan altamente tóxicos y presentan la propiedad de acumularse en los organismos vivos, elementos tales como el Cd, mercurio (Hg), Pb,

antimonio (Sb), bismuto (Bi), estaño (Sn), talio (Tl) (García & Dorronsoro, 2005). Para que un ión de alguno de los elementos tenga un efecto fisiológico o tóxico sobre un organismo, primero debe entrar a la célula. Los cationes metálicos divalentes (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+}) son estructuralmente muy similares entre sí; todos ellos tienen diámetros iónicos entre 138 y 160 pm y una doble carga positiva. De esta manera, por su semejanza estructural, ciertos cationes metálicos divalentes pueden desplazar a otros con funciones fisiológicas importantes en la célula. Por ejemplo, si el Zn^{2+} es reemplazado por Ni^{2+} , o el berilio²⁺ (Be^{2+}) por Mn^{2+} en enzimas, éstas se desactivan y pierden su función. La sustitución de calcio²⁺ (Ca^{2+}) por otros metales en proteínas de la membrana provoca desórdenes funcionales (Nies, 1999).

Los metales pesados se encuentran generalmente como componentes naturales de la corteza terrestre, en forma de minerales, sales u otros compuestos. No pueden ser degradados o destruidos fácilmente de forma natural o biológica y no tienen funciones metabólicas específicas para los seres vivos (Abollino, *et al.*, 2002).

La toxicidad de los metales pesados depende de la concentración, la forma química y la persistencia (tiempo que tarda un contaminante en transformarse en una forma no tóxica). Un elemento indispensable para un ser vivo en concentraciones traza puede llegar a ser tóxico en concentraciones elevadas. La toxicidad está causada frecuentemente por la imposibilidad del organismo afectado para mantener los niveles necesarios de excreción. Los metales pesados están considerados como muy peligrosos para los seres vivos en general, pues poseen una gran toxicidad, en parte debido a su elevada tendencia a bioacumularse (Navarro-Aviñó, *et al.*, 2007).

La bioacumulación significa un aumento en la concentración de un producto químico en un organismo vivo en un cierto plazo de tiempo. Comparada a la concentración de dicho producto químico en el ambiente (Angelova, *et al.*, 2004). En un pequeño grado se pueden incorporar a organismos vivos (plantas y animales) por vía del alimento y lo pueden hacer a través del agua y el aire como medios de translocación y dependiendo de su movilidad en dichos medios (Lucho, *et al.*, 2005a).

Todas las plantas absorben metales del suelo donde se encuentran pero en distinto grado, dependiendo de la especie vegetal, y de las características y contenido en metales del

suelo. Las plantas pueden adoptar distintas estrategias frente a la presencia de metales en su entorno (Barceló & Poschenrieder, 2003). En las plantas, la asimilación de metales ocurre principalmente a través del sistema de raíces, en las cuales se encuentran la mayoría de los mecanismos para prevenir la toxicidad de los metales. El sistema de raíces provee una enorme área superficial que absorbe y acumula el agua y los nutrientes esenciales para el crecimiento. Las raíces de las plantas causan cambios en la interfase suelo-raíz, mientras eliminan compuestos inorgánicos y orgánicos (exudados de la raíz) en el área del suelo inmediatamente alrededor de las raíces (la rizosfera). Los exudados de las raíces afectan el número y la actividad de los microorganismos, la segregación y estabilidad de las partículas del suelo alrededor de la raíz, y la disponibilidad de los elementos. Además pueden incrementar (movilizar) o disminuir (inmovilizar) directa o indirectamente la disponibilidad de los elementos en la rizosfera (Villas, et al., 2004). La movilización e inmovilización de los elementos en la rizosfera pueden ser causadas por: 1) cambios en el pH del suelo, 2) eliminación de sustancias que forman complejos, como las moléculas quelantes de los metales, 3) cambios en el potencial óxido-reducción y, 4) la actividad microbiana (Villas, et al., 2004).

Los metales pesados como el Cd, Hg, Pb, Cr y el platino (Pt) están altamente presentes en el ambiente. Por desgracia, estos elementos no esenciales son tóxicos a concentraciones muy bajas, no son biodegradables y presentan una vida-media muy larga. Así, la exposición a metales pesados es potencialmente peligrosa. Porque tienen la capacidad de reabsorber y acumular los metales divalentes, los riñones son unos de los principales órganos blancos de la toxicidad de los metales pesados. Se ha demostrado que las intoxicaciones agudas y crónicas pueden ambas, causar nefropatías con niveles de gravedad que van desde disfunciones tubulares con el Síndrome de Fanconi hasta una severa insuficiencia renal teniendo a veces como consecuencia la muerte (Barbier, 2009).

La exposición al Cd se ha asociado con diferentes enfermedades como la hipertensión y se sabe que produce nefropatía. El Cd (II), es un metal pesado tóxico asociado con las operaciones mineras e industriales de Zn, donde el cadmio se ha utilizado para evitar la corrosión de la maquinaria. Resultando en la transmisión de cadmio por el aire, representando un peligro significativo para la salud. Por otra parte, las principales fuentes antropogénicas de Cd (minería, fundición y acabado de metales) a menudo contienen otros metales tales como Cr, Pb, Ni, selenio (Se), As y Zn que con frecuencia contaminan el suelo

y el agua (Adriano, 2001). La Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos ha clasificado el Cd como contaminante Grupo B1, lo que significa que es un probable carcinógeno humano, si se supera un límite permisible en agua de 5 ppb (Peer, et al., 2005).

La Organización Mundial de la Salud ha determinado que el Cr(VI) es un carcinógeno humano y la EPA lo ha clasificado como contaminante Grupo A, es decir, cancerígeno humano por exposición vía inhalación, si se supera un límite permisible de Cr total en agua de 100 ppb (Peer, et al., 2005). En forma de Cr(III) es un nutriente esencial y es relativamente no-tóxico para el hombre. Sin embargo, el Cr(VI) es un peligro para la salud de los humanos. Algunos problemas de salud que son causados por el Cr(VI) son: erupciones cutáneas, malestar de estómago y úlceras, problemas respiratorios, debilitamiento del sistema inmune, daño de los riñones e hígado, alteración del material genético y cáncer de pulmón (WHO, 1988).

En el ser humano, el Pb puede tener una amplia variedad de efectos biológicos según el nivel y la duración de la exposición. Se han observado efectos en el plano subcelular y efectos en el funcionamiento general del organismo que van desde la inhibición de las enzimas hasta la producción de acusados cambios morfológicos y la muerte. Como resultado de los efectos del Pb en el sistema hematopoyético disminuye la síntesis de la hemoglobina y se ha observado anemia en niños a concentraciones de Pb-H superiores a 40 µg/dL. Por razones neurológicas, metabólicas y comportamentales, los niños son más vulnerables a los efectos del Pb que los adultos (WHO, 1995). Los efectos del Pb en la función reproductora masculina se limitan a la morfología y el número de los espermatozoides. En cuanto a la femenina, se han atribuido al Pb algunos efectos adversos en el embarazo (WHO, 1995).

2.4 Tecnologías de remediación de metales pesados

En general, los mecanismos involucrados en la remoción de contaminantes son de tres tipos (Delgadillo-López, et al., 2011):

- Físicos: sedimentación, filtración, adsorción, volatilización
- Químicos: precipitación, hidrólisis, reacciones de óxido-reducción o fotoquímicas
- Biológicos: resultado del metabolismo microbiano, del metabolismo de plantas o de proceso de bioabsorción.

Recientemente, la fitorremediación, el uso de plantas para inmovilizar o extraer MP, ha tenido gran impacto en la recuperación de zonas contaminadas con metales pesados.

2.4.1 Fitorremediación

Es un conjunto de tecnologías que reducen *in situ* o *ex situ* la concentración de diversos compuestos a partir de procesos bioquímicos realizados por las plantas y microorganismos asociados a ellas. La fitorremediación utiliza las plantas para remover, reducir, transformar, mineralizar, degradar, volatilizar o estabilizar contaminantes (Kelley, et al., 2000). Estas fitotecnologías ofrecen numerosas ventajas en relación con los métodos fisicoquímicos que se usan en la actualidad, e.g. su amplia aplicabilidad y bajo costo (Tabla 2).

Tabla 2. Ventajas y desventajas de la fitorremediación

Ventajas	Desventajas
1. Se puede realizar <i>in situ</i> y <i>ex situ</i> .	1. En especies como los árboles o arbustos, la fitorremediación es un proceso relativamente lento.
2. Se realiza sin necesidad de transportar el sustrato contaminado, con lo que se disminuye la diseminación de contaminantes a través del aire o del agua.	2. Se restringe a sitios de contaminación superficial dentro de la rizósfera de la planta.
3. Es una tecnología sustentable.	3. El crecimiento de las plantas está limitado por concentraciones tóxicas de contaminantes, por lo tanto, es aplicable a ambientes con concentraciones bajas de contaminantes.
4. Es eficiente tanto para contaminantes orgánicos como inorgánicos.	4. Los contaminantes acumulados en maderas pueden liberarse por procesos de combustión.
5. Es de bajo costo.	5. No todas las plantas son tolerantes o acumuladoras.
6. No requiere personal especializado para su manejo.	6. La solubilidad de algunos contaminantes puede incrementarse, resultando en un mayor daño ambiental o migración de contaminantes.
7. No requiere consumo de energía.	7. Se requieren áreas relativamente grandes.
8. Sólo requiere de prácticas agronómicas convencionales.	8. En sistemas acuáticos se puede favorecer la diseminación de plagas tales como los mosquitos.
9. Es poco perjudicial para el ambiente.	
10. Actúa positivamente sobre el suelo, mejorando sus propiedades físicas y químicas, debido a la formación de una cubierta vegetal.	
11. Tiene una alta probabilidad de ser aceptada por el público, ya que es estéticamente agradable.	
12. Permite el reciclado de recursos (agua, biomasa, metales).	

Fuente: (Delgadillo, et al., 2011)

Se han identificado una amplia diversidad de especies que se emplean para este fin. Algunas de ellas, debido a su gran capacidad para acumular metales pesados, reciben el

nombre de hiperacumuladoras. Estas plantas, deben acumular al menos 100 µg/g (0.01% peso seco) de Cd y As; 1000 µg/g (0.1% peso seco) de Co, Cu, Cr, Ni y Pb (Watanabe, et al., 2000). Se deben considerar dos factores importantes para que una planta sea un buen fitoextractor, su biomasa y su eficiencia de bioconcentración. A pesar de que existen plantas hiperacumuladoras que son buenas candidatas para la fitorremediación, muchas de ellas poseen poca biomasa (Delgadillo-López, et al., 2011). Los mecanismos de tolerancia varían entre las distintas especies de plantas y están determinados por el tipo de metal, eficiencia de absorción, translocación y secuestro (Delgadillo-López, et al., 2011).

Las fases del proceso por el cual las plantas incorporan y acumulan metales pesados son las siguientes:

Fase I. Implica el transporte de los metales pesados al interior de la planta y después, al interior de la célula. La raíz constituye el tejido de entrada principal de los metales, los cuales llegan por difusión en el medio, mediante flujo masivo o por intercambio catiónico. La raíz posee cargas negativas en sus células, debido a la presencia de grupos carboxilo, que interaccionan con las positivas de los metales pesados, creando un equilibrio dinámico que facilita la entrada hacia el interior celular, ya sea por vía apoplástica o simplástica.

Fase II. Una vez dentro de la planta, las especies metálicas son secuestradas o acomplejadas mediante la unión a ligandos específicos. Entre los quelantes producidos por las plantas se encuentran los ácidos orgánicos (ácido cítrico, oxálico y málico), algunos aminoácidos (histidina y cisteína) y dos clases de péptidos: fitoquelatinas y metaloteínas.

Fase III. Involucra la compartimentalización y detoxificación, proceso por el cual, el complejo ligando-metal queda retenido en la vacuola (Navarro-Aviñó, et al., 2007).

La fitoextracción o fitoacumulación consiste en la absorción de metales contaminantes mediante las raíces de las plantas y su acumulación en tallos y hojas. El primer paso para la aplicación de esta técnica es la selección de las especies de planta más adecuada para los metales presentes y las características de emplazamiento. Una vez completado el desarrollo vegetativo de la planta el siguiente paso es cosecharlas y proceder a su incineración y traslado de las cenizas a un vertedero de seguridad. La fitoacumulación se

puede repetirse ilimitadamente hasta que la concentración remanente de metales en el suelo esté dentro de los límites considerados como aceptables (Kumar, et al., 1995).

Una forma de conocer como puede ser afectada una planta en presencia de metales pesados es mediante la determinación de parámetros de tolerancia como:

La densidad de la raíz en el perfil del suelo es indicador de resistencia y tolerancia a condiciones de sequía, permitiéndole a los cultivos expresar su potencial de producción de biomasa (MS) y granos (Haqqani & Pandey, 1994).

El contenido relativo de agua (CRA) es la expresión más usada para medir el nivel de agua de un tejido. Es una medida del contenido de agua respecto al total de agua que este puede almacenar, se expresa como porcentaje y permite conocer el estado hídrico de la planta (Acevedo, 2006).

La tasa de crecimiento relativo (TCR) se define como el incremento de biomasa por unidad de biomasa y tiempo (Antúnez, et al., 2001).

El índice de tolerancia (IT) es la relación entre la longitud radical de las plántulas que crecieron en presencia del metal específico adicionado y la longitud radical de las plántulas crecidas en ausencia del metal (Labra-Cardón, et al., 2012).

Estudios demuestran el EDTA puede incrementar la absorción de algunos metales, por ello se evaluará su efecto en la acumulación, pues por la flexibilidad de su molécula y la especial disposición espacial de sus átomos y grupos químicos, actúa como agente quelante llegando a coordinarse octaédricamente con iones metálicos mediante el establecimiento de seis grupos coordinados. La reacción de quelación que lleva a cabo el EDTA sobre iones metálicos que forman parte de moléculas con actividad biológica, conlleva la inactivación de dichas sustancias y la inhibición de su actividad biológica (Segura, et al., 1997).

2.4.2 Aplicación del cultivo *in vitro* en la fitorremediación

La explotación del potencial de las plantas para remediación ambiental está restringida por nuestro limitado conocimiento de las vías metabólicas y mecanismos de tolerancia involucrados. Aunque se han hecho progresos sustanciales en los recientes años, se deben

sumar esfuerzos para elucidar los mecanismos bioquímicos y fisiológicos involucrados en las interacciones entre las células vegetales y los compuestos tóxicos. Diversos sistemas experimentales están disponibles, entre ellos el uso de plantas transgénicas (Doran, 2009). Se ha obtenido conocimiento a partir de estudios moleculares de plantas, lo que ha conducido al desarrollo de algunos transgénicos prometedores que muestran una mayor tolerancia, acumulación y/o capacidad de degradación para diversos contaminantes. Estos han sido probados en estudios de laboratorio usando medios contaminados artificialmente en lugar de los suelos de campo (Pilon, 2005). Por otro lado, el cultivo de tejidos vegetales, ofrece el uso de extractos celulares, cultivos celulares desdiferenciados, cultivo de órganos como raíz y tallos, explantes como discos de hoja, plántulas y plantas completas, evaluados en sustratos contaminados bajo cultivos *in vitro*, con el objetivo de conocer los mecanismos y potencial de las especies vegetales evaluadas (Doran, 2009).

La aplicabilidad de los cultivos *in vitro* depende del propósito original de la investigación. El cultivo *in vitro* de células vegetales y de órganos se han aplicado en numerosos estudios encaminados a identificar la capacidad de las células de las plantas para tolerar, asimilar, desintoxicar, metabolizar y almacenar una variedad de contaminantes orgánicos y metales pesados. Esto ofrece una evaluación crítica de la aplicación de cultivos de tejidos vegetales en la investigación de la fitorremediación. Eso identifica aquellas áreas donde los cultivos *in vitro* ofrecen el mayor potencial como dispositivos para el estudio práctico de los procesos y mecanismos de la fitorremediación. También se describen las limitaciones inherentes en el uso de cultivos de tejidos en lugar de toda la planta en los programas de investigación (Doran, 2009).

El cultivo de tejidos de plantas implica el crecimiento de las células vegetales y tejidos *in vitro* en un ambiente libre de microorganismos. Células vegetales se cultivan en forma de callo o suspensión de células; órganos diferenciados, como las raíces y los brotes también se pueden propagar *in vitro*. Una vez establecidos estos cultivos *in vitro*, pueden propagarse indefinidamente y estar disponibles bajo demanda. Por el contrario, los sistemas empleando plantas enteras cultivadas ya sea en el suelo o hidropónico tienen una vida útil limitada y cada planta necesita ser reemplazada y restablecida después de cada experimento. Por lo tanto, el tiempo necesario para llevar a cabo investigaciones experimentales se puede reducir sustancialmente con el uso de cultivos de tejidos en lugar de plantas enteras (Doran, 2009).

Cultivos in vitro de plantas y manteniéndolos libre de contaminación microbiana, pueden ser utilizados para distinguir las respuestas y las capacidades metabólicas de células de plantas y las de los microorganismos normalmente presentes en los tejidos de la rizósfera de plantas (Chaudry, et al., 2005).

La capacidad de incorporar a los cultivos in vitro, cantidades relativamente grandes de contaminantes, que puedan no estar disponibles desde el suelo a niveles similares (Lucero, et al., 1999) permite la recuperación de metabolitos y compuestos intermedios en cantidades adecuadas para análisis de espectrometría de masas o resonancia magnética nuclear (Laurent, et al., 2007), proporcionando una significativa ventaja para la investigación bioquímica y metabólica.

2.5 *Prosopis laevigata*

Prosopis laevigata, es el mezquite típico del Centro de México, es la especie dominante en Zacatecas, San Luis Potosí y centro y sur de Tamaulipas. Se distribuye en las isoyetas 300 a 900 mm, y en altitudes hasta de 2500 msnm. Se presenta en forma de árboles con altura de 6 a 7 m, así como arbustiva de 2 a 3 m; de su madera se fabrican muebles, puertas, carretas, artesanías y hasta juguetes. También se le utiliza como combustible y sus frutos se emplean intensivamente como forraje para ganado; el fruto también es consumido como alimento por los habitantes de la región (Maldonado & De la Garza, 2000).

2.5.1 Descripción botánica de *Prosopis laevigata*

P. laevigata es un arbusto o árbol leñoso de copa redonda y aplanada, cuyo tallo se ramifica a baja altura, en ocasiones al nivel del suelo. Alcanza hasta 12 a 14 m de altura. La madera es dura y pesada, en el centro es café o negra, muy durable por su dureza y consistencia; presenta flores en racimos de 4 a 10 cm de largo, color blanco verdoso, vainas rectas o ligeramente curvas de 7 a 20 cm de largo por 8 a 15 mm de ancho, color amarillento a rojizo, con semillas lisas color café claro de 8 a 10 mm de largo. Sus hojas son compuestas de uno a dos pares, pinnadas con 20 a 40 folíolos de 5 a 10 mm de largo, color verde pálido o grisáceo. La raíz es profunda y las ramas presentan espinas laterales (Cedillo & Mayoral, 1997).

La clasificación taxonómica de la especie es la siguiente:

Familia: Fabaceae (alt. Leguminosae)

Subfamilia: Mimosoidae

Género: *Prosopis*

Especie: *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. Ex Willd.) M. C. Johnst.

Sinonimias: *Prosopis dulcis* Kunth, *Algorobia dulcis* (Kunt) Benth, *Mimosa rotundata* Sessé et Moc., *Neltuma laevigata* (Willd.) Britt. et Rose.

Respecto al crecimiento de *Prosopis laevigata*, éste se encuentra íntimamente relacionado con la profundidad del suelo y la disponibilidad de agua en el subsuelo. Por tal motivo, los ejemplares que alcanzan mayor altura y grosor del fuste, se localizan en valles con suelos profundos, así como en los márgenes de ríos y arroyos, alrededor de los cuerpos de agua y en sectores con drenaje de los escasos escurrimientos en zonas áridas y semiáridas (Ruiz, 2011).

2.5.2 Distribución de *P. laevigata*

La especie se desarrolla en zonas templadas, áridas y semiáridas, donde son muy comunes las temperaturas extremas, entre 0 y 48°C, precipitaciones escasas. Prospera mejor en suelos arenosos profundos de buen drenaje (Ruiz, 2011). Se localiza en el centro y sur de México, en ambientes muy diversos que van desde los subhúmedos hasta áreas con precipitaciones de 300 mm anuales o menos; se encuentra en los estados de Baja California Sur, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz, Nuevo León, Querétaro, Aguascalientes, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Zacatecas, Estado de México, Distrito Federal, Guerrero y Chiapas (INE, 1994).

2.5.3 Usos de *P. laevigata*

Uno de los recursos naturales más utilizados por los habitantes del Altiplano potosino a través del tiempo ha sido *Prosopis* spp. (mezquite) debido a los grandes beneficios económicos y ecológicos que presenta. El 96.5 % de los productores utiliza la vaina de mezquite ya sea como forraje (durante los meses de diciembre a junio), alimento o para su venta, sobresaliendo su uso en la alimentación animal durante la época de estiaje; la alimentación del ganado se basa principalmente en agostadero y en menor medida en alimento comercial y desperdicios de cocina. La producción estimada de vaina de *P. laevigata* es de 3.7 toneladas por hectárea, con una densidad promedio de 194 árboles. El mezquite es un recurso natural que sigue siendo ampliamente importante para los habitantes del Altiplano potosino, sobresaliendo su uso dentro del desarrollo de las

actividades pecuarias siendo una fuente nutricional para el ganado con beneficios para los productores de bajos recursos (Ruiz, 2011). La colecta de vaina de mezquite por día llega a ser hasta 100 kg, así mismo se compra vaina como complemento a lo recolectado. En lo que respecta a la venta sólo 4% lo hace, de éstos el 2% vende la vaina de mezquite entera y 2% la vende molida; el precio es de 2 a 3 pesos entera y de 4 a 4.50 pesos molida. Por ello, la vaina de mezquite es un recurso natural que sigue siendo importante para los habitantes del Altiplano potosino (Ruiz, 2011).

En lo que respecta a la alimentación humana la vaina se puede consumir entre otras maneras como fruta fresca, fruta en almíbar, pinole de mezquite, atole de mezquite, vino de mezquite, entre otras. Las vainas de mezquite se han propuesto como una fuente de alimentación para consumo humano, ya que contienen grandes cantidades de carbohidratos y el contenido proteínico de las semillas es similar al del frijol soya. La harina hecha de semillas y vainas del mezquite mezcladas en pequeñas cantidades con harina de trigo ha sido probada en varias recetas que incluyen panes y galletas y han tenido resultados favorables (Ruiz, 2011).

2.5.4. Estudios de fitorremediación en *P. laevigata*

Recientemente se ha identificado a *P. laevigata*, como acumulador de Cr(VI) y Cd(II) en concentraciones de 0.0-3.4 mM de Cr(VI) (~0-176 mg/L) y 0.0-2.2 mM de Cd(II) (~0-247 mg/L). Los metales pesados no interrumpieron el proceso de germinación de la semilla expuesta a esos MP, pero las plántulas fueron más pequeñas, con menos hojas y menos raíces secundarias. Las plántulas mostraron una acumulación de 8,176 y 21,437 mg/kg de Cd y de 5,461 y 8,090 mg/kg de Cr de peso seco, en tallos y raíces. Por lo cual, *P. laevigata* puede ser considerado como un potencial hiperacumulador de Cd(II) y Cr(VI) (Buendía-González, *et al.*, 2010).

Así mismo, se determinó el crecimiento, sobrevivencia y acumulación de Pb(II) y Ni(II) en plántulas de *P. laevigata*, en una concentración de 0.0-4.2 mM Ni(II) (~0-246 mg/L) y 0.0-3.0 mM Pb(II) (~0-621 mg/L). Las plántulas mostraron una acumulación en tallos y raíces de 2,582 y 3,895 mg/kg de Ni y 27,300 y 40,666 mg/kg de Pb en base seca (b. s.) cuando son cultivados con 1.26 mM de Ni (~73 mg/L) y 3.0 mM de Pb (~621 mg/L), respectivamente. *P. laevigata* es una especie que crece en las zonas áridas, por lo que tiene una fisiología especializada que lo hace prosperar en un medio ambiente con

extremas condiciones. Esto sugiere que *P. laevigata* posee el potencial genético para responder en condiciones de desierto y otros tipos de estrés, tales como metales pesados en suelos contaminados (Buendía-González, *et al.*, 2010).

En otro estudio, se obtuvieron plántulas vía embriogénesis somática. Con el fin de investigar si las plántulas obtenidas retienen su capacidad de acumular una alta cantidad de metales pesados, las plántulas (1.5-2.0 cm de longitud) se transfirieron a medio MS que contenía 0.5 mM de Cd, Cr, Ni o Pb (~56, 25, 29 y 103 mg/L, respectivamente). Todas las plántulas fueron capaces de tolerar y crecer bajo la exposición a los diferentes metales pesados. Además, la acumulación de Cd fue significativamente más alta que para el resto de MP, mostrando una acumulación de 5,688 y 14,473 mg/kg de Cd de peso seco en tallos y raíces, respectivamente. Estos resultados indican que la cantidad de metales acumulados por las plántulas obtenidas vía embriogénesis somática eran 1.5 veces más bajos que los registrados en estudios previos con plántulas silvestres de *P. laevigata* cultivadas bajo condiciones *in vitro*. Sin embargo, en este último estudio, la concentración de MP en el medio fue mayor que en el primer caso (Buendía-González, *et al.*, 2010). Por ello, los datos indican que las plántulas de la embriogénesis somática pueden ser considerados como hiperacumuladores de metales pesados (Buendía-González, *et al.*, 2011).

Capítulo 3

Justificación

En México, como consecuencia del desarrollo industrial, se registra una creciente contaminación ambiental, sobre todo a raíz de varios siglos de actividad minera y, desde hace décadas, por la intensa explotación petrolera. La industria minera es una de las actividades económicas de mayor tradición en México, la cual, es mayoritariamente metálica y se dedica principalmente a la producción de Cu, Zn, Ag y Pb (Velasco, *et al.*, 2004). El Pb, Cr, As, Cd y Hg, están relacionados con problemas de salud como retrasos en el desarrollo, varios tipos de cáncer, daños en el riñón, e incluso, con casos de muerte (Muchuwei, *et al.*, 2006). La fitorremediación, que emplea a las plantas para remover, contener o degradar contaminantes del suelo o agua, ha tenido impacto en la recuperación de zonas contaminadas, sin embargo, uno de los principales problemas de la técnica es identificar especies con capacidad para tolerar, crecer y bioacumular varios metales de forma simultánea, dado que las zonas contaminadas presentan más de un metal en alta concentración. Se ha reportado que *P. laevigata* posee capacidad de acumular cantidades importantes de metal pesado en sus tejidos cuando la planta es expuesta a medios de cultivo artificialmente contaminados en un sistema *in vitro*. Por ello, el desarrollo de este trabajo tuvo como finalidad generar información, sobre la tolerancia y acumulación de la mezcla de cuatro metales pesados (Pb, Cd, Ni y Cr, en combinaciones de 2 MP, 3 MP y 4 MP, con y sin EDTA) en plántulas de *P. laevigata* bajo condiciones *in vitro*, para conocer el potencial de absorción de los MP, y con ello el posible riesgo de bioacumulación en el ganado que lo consume.

Capítulo 4

Hipótesis

El contenido y número de metales pesados que es capaz de bioacumular *Prosopis laevigata*, posiblemente pueden identificarla como una especie fitorremediadora y si no existe control, con riesgo potencial de contaminar la cadena alimentaria al ser consumida por el ganado.

Capítulo 5

Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar el contenido y número de metales que bioacumulan, en la parte aérea, plantas de *Prosopis laevigata* creciendo en medios artificialmente contaminados por diferentes metales pesados de forma simultánea, y con ello el potencial riesgo del ganado, al consumir la planta.

5.2 Objetivos particulares

- Establecimiento de cultivos asépticos, *in vitro*, de plantas de *Prosopis laevigata*.
- Evaluar el efecto de diferentes metales pesados en la germinación de semillas de *P. laevigata* creciendo en medios artificialmente contaminados.
- Evaluar el efecto de diferentes metales pesados en el crecimiento de plántulas de *P. laevigata* creciendo en medios artificialmente contaminados.
- Determinar el contenido y número de metales pesados bioacumulados en tejido aéreo y raíz de plántulas de *P. laevigata*.

Capítulo 6

Metodología



6.1 Material vegetal

Vainas maduras de *P. laevigata*, fueron colectadas en el estado de San Luis Potosí, México en el año 2012. Las semillas fueron extraídas cuidadosamente de las vainas y posteriormente fueron escarificadas mecánicamente, mediante la remoción de un fragmento lateral de la cubierta de la semilla.

6.1.1 Cultivos *in vitro* de *P. laevigata*

El estudio se realizó en cultivos *in vitro* para conocer el potencial de la especie vegetal expuesta a los MP. Para el establecimiento del cultivo aséptico, posterior a la escarificación, las semillas se envolvieron en papel filtro para sumergirse en solución de detergente (1% *p/v*) durante 15 minutos en agitación suave y constante. Se enjuagaron con agua corriente hasta eliminar restos de jabón y se transfirieron a una solución de etanol al 70 % (*v/v*) durante 30 segundos. Enseguida se introdujeron en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.2% adicionando tween como tensoactivo (3 gotas por cada 100 ml de solución), durante 30 minutos, para finalmente en campana de flujo laminar, enjuagar con agua estéril desionizada, al menos 3 veces.

Las semillas desinfectadas superficialmente, fueron sembradas en tubos de cultivo con medio Murashige y Skoog (1962; MS) modificado, ya que algunas sales contenidas en el medio MS original son propensas a reaccionar violentamente o formar precipitados al entrar en contacto con metales pesados (Buendía-González, et al., 2009), conteniendo 30 g/L de sacarosa, 50 mg/L de cada metal (Pb, Ni, Cr, Cd), de forma individual, en mezcla de dos, tres y cuatro metales. Para esta última combinación de metales, los medios fueron enriquecidos con 0.5 μ M de EDTA, éste último para evaluar su efecto en la acumulación, estudios demuestran que puede incrementar la absorción de algunos metales. Se ajustó a un pH= 5.8 con NaOH 1N antes de esterilizar los medios en autoclave a 121 °C durante 18 min. Los tubos de cultivo incluían un puente de papel filtro como soporte para la semilla y/o plántula. Se utilizó medio líquido en lugar de un medio semisólido, ya que se ha reportado que la adición de agar puede aumentar el contenido de Ni en el medio de cultivo en un intervalo de 0.004-0.045 mmol/kg (George & Klerk, 2008). Las sales fuente de metales empleadas fueron $Pb(NO_3)_2$, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, $K_2Cr_2O_7$ y $CdCl_2 \cdot 2\frac{1}{2}H_2O$ (Baker Analyzed, Phillipsburg, NJ). Se realizaron soluciones stock de cada metal a una concentración de 10g/L.

6.2 Determinación de los parámetros de tolerancia

Las semillas y/o plántulas se observaron semanalmente, y a los 50 días de cultivo fueron cosechadas para determinar el porcentaje de germinación, el porcentaje de sobrevivencia, la longitud de tallo y raíz, así como el peso fresco (PF). Posteriormente, los tejidos fueron secados en estufa convencional a 60°C durante 72 horas, al término de este periodo, el material fue pesado, el dato fue registrado como peso seco (PS). Con estos datos, se determinaron parámetros de tolerancia, densidad de la raíz (DR), contenido de agua (CA), la tasa de crecimiento relativo (TCR) y el índice de tolerancia (IT), de acuerdo a las siguientes relaciones:

$$TCR(\%) = \frac{Biomasa\ total\ (PS)_{MP}}{Biomasa\ total\ (PS)_{control}} \times 100$$

$$IT = \frac{Longitud\ de\ raíz_{MP}}{Longitud\ de\ raíz_{control}}$$

$$DR\ (mg\ cm^{-1}) = \frac{Biomasa\ de\ raíz\ (mg,PS)}{Longitud\ de\ raíz_{(cm)}}$$

$$CA\ (\%) = \frac{Peso\ Fresco\ (PF) - Peso\ Seco\ (PS)}{Peso\ Fresco\ (PF)} \times 100$$

6.3 Análisis del contenido de metales en los tejidos vegetales y determinación de parámetros de bioconcentración

Las plántulas cosechadas a los 50 días de edad, fueron separadas en secciones de tallo y raíz y secadas como se indica en la sección anterior. 100 mg de tejido seco y molido, fue digerido con 5 ml de HNO₃ concentrado y agua desionizada, en un horno de microondas (CEM MARS-Xpress, CEM Corporation Mathews North Carolina). Al finalizar el proceso de digestión, las muestras fueron aforadas a 10 ml con agua desionizada. El contenido total de Cr, Pb, Cd y Ni en los tejidos vegetales se cuantificó mediante un espectrómetro de absorción atómica (Shimadzu AA-6300), por el método de flama. Las curvas estándar se prepararon con soluciones estándar de Cr (0.1, 0.5, 3 y 5 mg/L), Pb (1, 10, 20 y 30 mg/L), Ni (0.1, 5, 10 y 20 mg/L) y Cd (0.1, 1, 3 y 5 mg/L) (J.T. Baker, Xalostoc México), las cuales

mostraron coeficientes de correlación (r^2) de 0.9 o mejores. Todo el material de laboratorio empleado fue lavado con HNO_3 0.1 N antes de su uso.

Los datos de la concentración del metal fueron empleados para determinar el factor de bioacumulación (FB) y el factor de translocación (FT), los cuales están definidos como:

$$FB = \frac{[MP]_{\text{parte aérea}}}{[MP]_{\text{medio de cultivo}}}$$

Dónde: MP= metal pesado (mg/kg)

El cálculo del factor de bioconcentración o bioacumulación se hace para estimar la relación entre los residuos químicos en las plantas y las concentraciones medidas en el medio donde viven (suelo) (Mendieta & Taisigue, 2014).

$$FT = \frac{[MP]_{\text{parte aérea}}}{[MP]_{\text{raíz}}}$$

Dónde: MP= metal pesado (mg/kg)

Los factores de translocación a los diferentes órganos vegetativos son el resultado de la división de la concentración en el órgano de interés (tallo, hojas, flores, semillas o frutos) entre la concentración en la raíz (Mendieta & Taisigue, 2014).

6.4 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron en lotes de 5 tubos por tratamiento y por triplicado, conteniendo una semilla por tubo de cultivo. Los datos obtenidos (germinación, sobrevivencia, longitud de la raíz y tallo, DR, CA, TCR, IT, FT y FB), fueron sujetos a un análisis de varianza, y la comparación de medias, usando la prueba de Tukey ($p \leq 0.5$).

Capítulo 7

Resultados y discusión

7.1 Germinación y sobrevivencia de *P. laevigata*

Bajo el proceso de desinfección de la semilla evaluado, se lograron cultivos libres de microorganismos. *Prosopis laevigata* fue capaz de germinar bajo todos los tratamientos evaluados sin mostrar diferencias significativas con respecto al tratamiento control (100%) (Fig. 1). Se ha reportado en otros estudios, que *P. laevigata*, mostró una germinación del 100% en cultivos *in vitro*, independientemente de las concentraciones utilizadas de Cd(II), Cr(VI), Pb(II) y Ni(II), las cuales fueron de 0.0-2.2 mM (~0-247 mg/L), 0.0-3.4 mM (~0-176 mg/L), 0.0-3.0 mM (~0-621 mg/L) y 0.0-4.2 mM (~0-246 mg/L), respectivamente (Buendía-González, et al., 2010).

La germinación de semillas es un buen indicador de la tolerancia de las plantas contra agentes contaminantes (Carrillo-Castañeda, et al., 2002). Otros trabajos, han reportado una significativa disminución en el porcentaje de germinación de semillas de *Medicago sativa* (alfalfa; 50%) en medios conteniendo 10.0-40.0 mg/L de Cr(VI) (~0.1-0.7 mM), con respecto al medio control (sin cromo), después de 14 días de cultivo (Peralta, 2001).

Respecto a la sobrevivencia, los tratamientos conteniendo Cd, CrNi, PbCrNi, CrCdNi y PbCrNiCd, aunque mostraron una disminución en el porcentaje de sobrevivencia, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos y el control (sin MP) (Fig. 1). En general, la morfología de las plántulas se vio afectada al incrementar el número de MP, ya que algunas no lograron el desarrollo de hojas ni raíces secundarias en el tiempo del cultivo (50 d), es decir, sólo se observó la emergencia de la radícula.

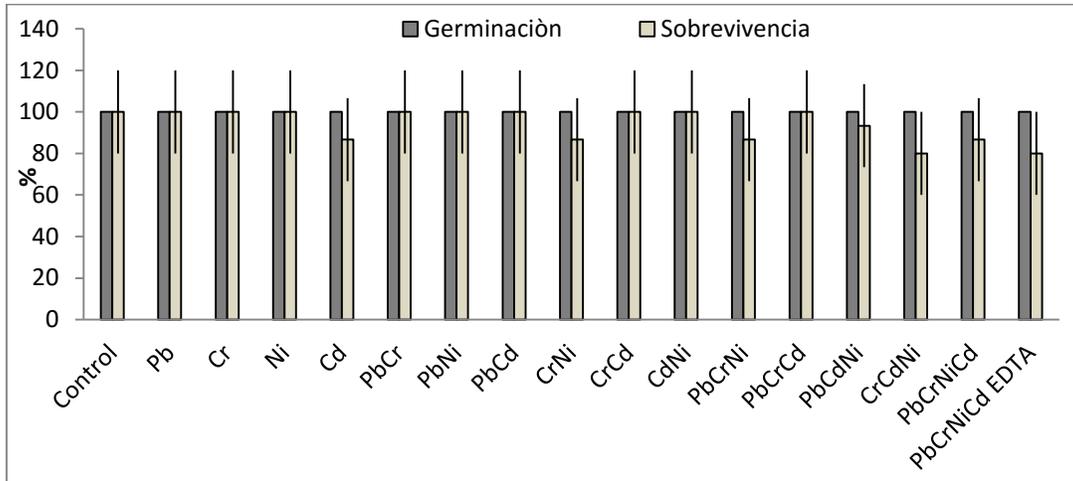


Fig 1. Porcentaje de germinación y sobrevivencia de *P. laevigata* en medios contaminados con MP. Las barras representan la desviación estándar (n=3).

El contenido relativo de agua (CRA) es otro parámetro indicativo de la tolerancia de la planta a MP, ya que puede ser alterada bajo estrés por MP. Los tratamientos con el CRA más afectados fueron Ni, Cd, PbNi, CrNi, CrCd, y PbCdNi (Fig. 2). Esto se ha reportado en un estudio con semillas de *Cosmos bipinnatus*, las cuales se cultivaron *in vitro* durante 30 días con concentraciones de Cr(VI) de 0.0-2.0 mM (~0-103 mg/L), en donde el CRA para plántulas cultivadas en 0.1-1.0 mM (~5.2-51.9 mg/L) de Cr(VI) no fue significativamente diferente al del tratamiento control, pero una deshidratación evidente se produjo en las plántulas en presencia de 2.0 mM (~103 mg/L) de Cr(VI) (Santiago-Cruz, et al., 2014). El Cr(VI) pueden reducir el potencial hídrico y la tasa de transpiración, también puede aumentar la resistencia al transporte difusivo, impactando significativamente la absorción de nutrientes y agua por la planta (Chatterjee & Chatterjee, 2000).

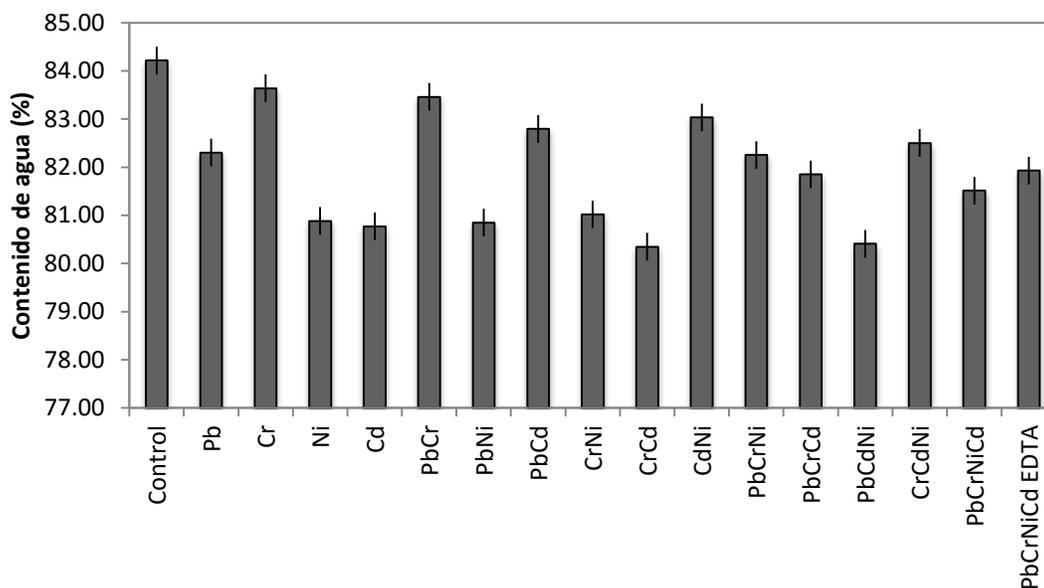


Fig 2. Contenido de agua de *P. laevigata* en medios contaminados con MP. Las barras representan la desviación estándar (n=3).

7.2 Crecimiento y desarrollo

La longitud de las plántulas expuestas a MP, fue afectada significativamente en todos los tratamientos, con excepción del medio conteniendo Pb, debido a que tuvieron un crecimiento significativamente menor al control (sin MP), tanto en los tejidos de tallos como en raíces (Fig. 3). Ruiz-Huerta y Armienta-Hernández (2012) evaluaron la acumulación y efecto de As, Pb, Zn, Cu, Fe y Cd, en el desarrollo de plantas de maíz (*Zea mays L.*) variedad H-515, crecidas en un invernadero bajo condiciones controladas (temperatura, humedad relativa y radiación solar) por 30 y 70 días, donde reportan, que las plantas de maíz expuestas a las mayores concentraciones de As (456 y 3744 mg/kg) y metales mostraron síntomas visibles de afección como necrosis, clorosis, adelgazamiento de las hojas e inhibición del crecimiento.

La captación de metales pesados por raíces puede ser un proceso tanto pasivo (no metabólico) como activo (metabólico), estos mecanismos de captación difieren dependiendo del metal. El Pb y el Ni son absorbidos pasivamente (Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

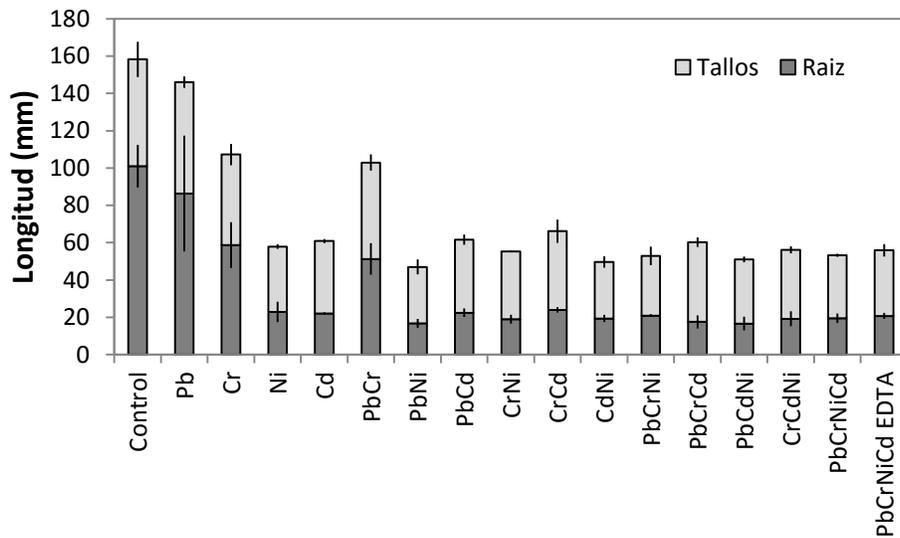


Fig 3. Crecimiento de tallos y raíces de *P. laevigata* en medios contaminados con MP. Las barras representan la desviación estándar (n=3).

7.3 Parámetros de tolerancia

La densidad de la raíz (DR), es un parámetro que puede ser afectado por la presencia de los MP. En este estudio, la DR en los tratamientos conteniendo Ni, Cd, PbCrNiCd (con y sin la adición de EDTA) no tuvieron diferencia significativa con el tratamiento control (5.1, 4.9, 5.1 y 5.3 mg/cm, respectivamente), y el resto de los tratamientos, registraron una densidad de raíz mayor al tratamiento control, alcanzando un valor de 9.7 mg/cm en el tratamiento PbCrCd (Fig. 4). Con la presencia simultánea (mezcla) de metales pesados, sus efectos pueden ser tanto tóxicamente sinérgicos (la toxicidad aumenta al mezclarse) o antagónicos (la toxicidad se reduce al mezclarse), por tanto existe cierta dificultad para predecir los efectos reales de los contaminantes en el medio (Navarro-Aviñó, et al., 2007). La densidad de las raíces es indicador de resistencia y tolerancia a condiciones de estrés, permitiéndole a los cultivos expresar su potencial de producción de biomasa (MS) y granos (Haqqani & Pandey, 1994).

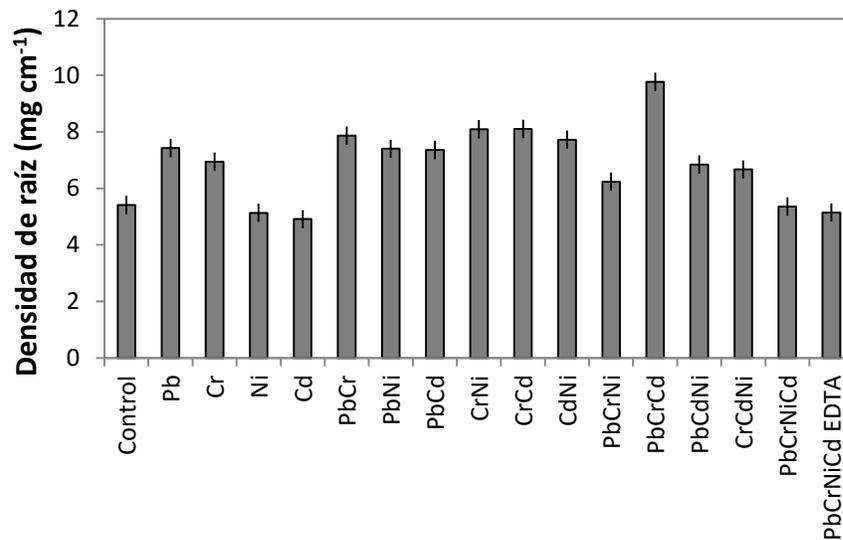


Fig 4. Densidad de raíz de *P. laevigata* en medios contaminados con MP. Las barras representan la desviación estándar (n=3).

La tolerancia a elementos potencialmente tóxicos (metales esenciales y no esenciales) en los organismos vegetales puede definirse como el resultado de un proceso evolutivo que confiere a distintas especies de plantas la capacidad de crecer y desarrollarse en ambientes con concentraciones elevadas de elementos potencialmente tóxicos (Hall, 2002).

Otro parámetro determinado fue el índice de tolerancia (IT), en general, todos los tratamientos mostraron una significativa reducción en este parámetro, con excepción del tratamiento conteniendo Pb (IT=0.85), ya que no hubo diferencia significativa con el tratamiento control. Buendía-González et al. (2010 a, b), reportaron que después de 50 días de cultivo de plántulas de *P. laevigata* creciendo en medios contaminados con 0.0-2.2 mM de Cd(II) (~0-247 mg/L), 0.0-3.4 mM Cr(VI) (~0-176 mg/L), 0.0-3.0 mM de Pb(II) (~0-621 mg/L) y 0.0-4.2 mM de Ni(II) (~0-246 mg/L) de forma individual, en todos los tratamientos mostró un IT menor al control, el cual fue disminuyendo conforme había un incremento en la concentración del metal, el Cd fue el metal que mayormente afectó a las plántulas, a una concentración de 2.2 mM (~247 mg/L).

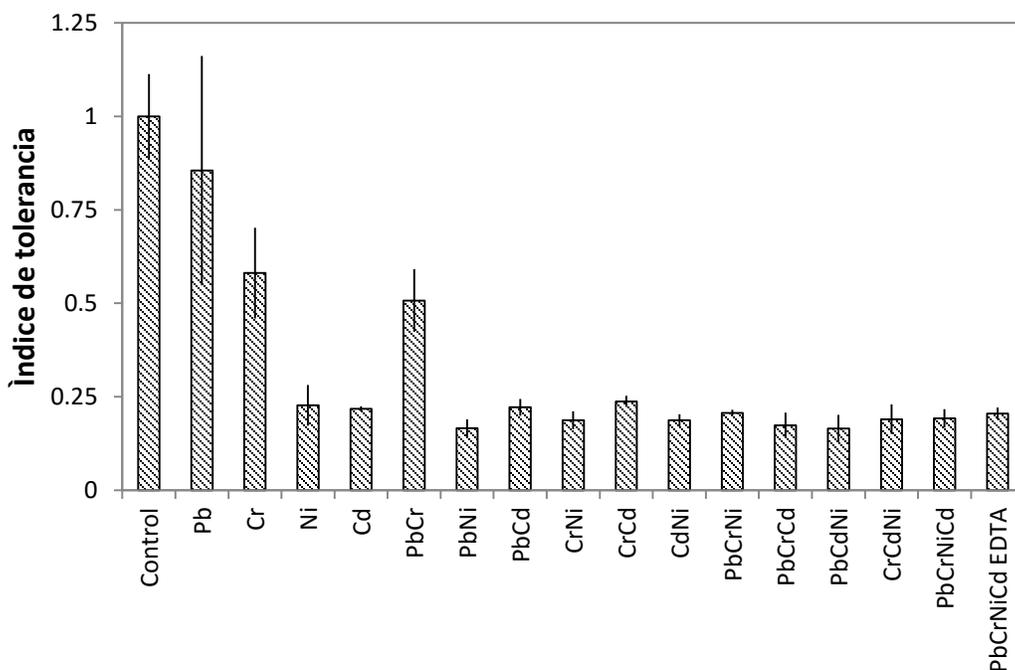


Fig 5. Índice de Tolerancia de *P. laevigata* en medios contaminados con MP. Las barras representan la desviación estándar (n=3).

El crecimiento se refiere a un incremento irreversible de materia seca o volumen, cambios en tamaño, masa, forma y/o número, como una función del genotipo y el complejo ambiental, dando como resultado un aumento cuantitativo del tamaño y peso de la planta (Kru, 1997). El análisis de crecimiento es una aproximación cuantitativa para entender el crecimiento de una planta o de una población de plantas bajo condiciones ambientales naturales o controladas (Clavijo, 1989).

Referente al crecimiento relativo de las plántulas de *P. laevigata* expuestas a los MP, los tratamientos conteniendo Pb, Cr, PbCr y CrCd no mostraron diferencia significativa con el tratamiento control (sin MP). Mientras que los restantes tratamientos, sufrieron una disminución en el crecimiento y el tratamiento PbCrNiCd EDTA fue el más afectado (Fig. 6). Banerjee & Sarker (1997) obtuvieron tasas de crecimiento relativo negativas para *S. rotundifolia* después de estar en contacto con Pb durante 6 días.

En un estudio efectuado en invernadero, donde se evaluó la eficiencia de absorción de Cr, Cd, Pb y CrCdPb (1 ppm de cada metal), por *Salvinia herzogii* y *Pistia stratiotes*, las tasas de crecimiento relativo fueron positivas para las dos especies. No se encontraron

diferencias significativas, en el crecimiento entre ambas especies, excepto para el Cd que afectó la tasa de crecimiento de *P. stratiotes*. Sin embargo, el crecimiento de las plantas se vio afectado por la presencia de los tres metales combinados, lo cual produciría un efecto de sinergismo (Paris, et al., 2005).

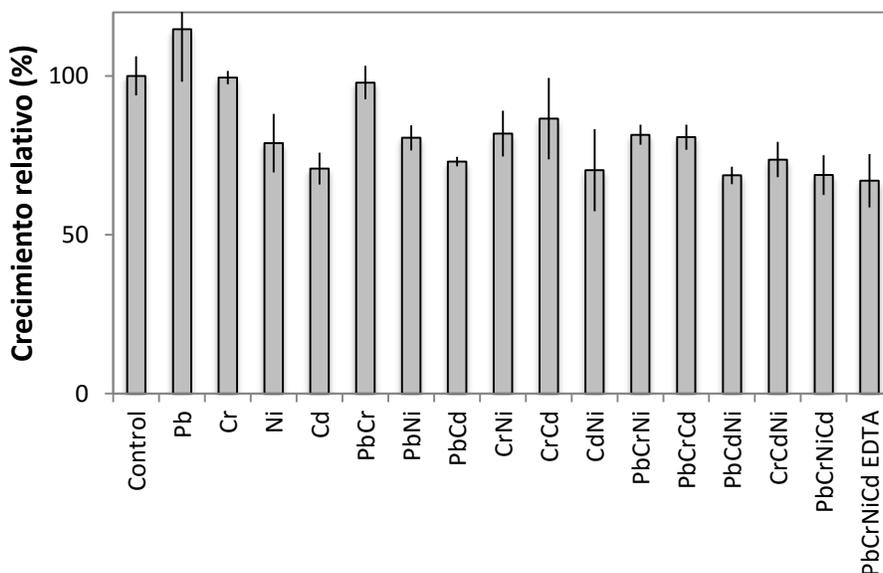


Fig 6. Crecimiento relativo de *P. laevigata* en medios contaminados con MP. Las barras representan la desviación estándar (n=3).

7.4 Acumulación de metales en los tejidos de *P. laevigata*

En cuanto a la acumulación en los tratamientos con el metal de forma individual, en los tallos Pb y Ni fueron los metales significativamente mayormente acumulados (785 mg/kg y 734 mg/kg PS, respectivamente). Mientras que el Cd y Cr se acumularon en menor cantidad. Por lo que el orden de acumulación fue $Pb \geq Ni > Cd >> Cr$ (Fig. 7a).

En términos generales, la acumulación de los metales fue mayor en los tejidos de raíz que en tallos. En la raíz, el Cr fue el metal significativamente mayormente acumulado, con 6558 mg kg⁻¹, mientras que la acumulación siguió el orden $Cr >> Pb >> Ni > Cd$ (Fig. 7b). Destaca el comportamiento en la acumulación del Cr en la raíz, al ser el metal mayormente absorbido, mientras que en tallo fue el metal con menor acumulación.

Los compuestos inorgánicos considerados teóricamente como los más fácilmente biodisponibles para las plantas son el As, Cd, Cu, Ni, Se y Zn; moderadamente biodisponibles son el Co, Fe y Mn; y poco biodisponibles son, el Cr, Pb y uranio (U), a pesar de esto, incluso las especies químicas menos biodisponibles pueden ser absorbidas por las plantas con ayuda, según los casos, de agentes quelantes o bien de agentes oxidantes (Rodríguez & García-Cortés, 2006).

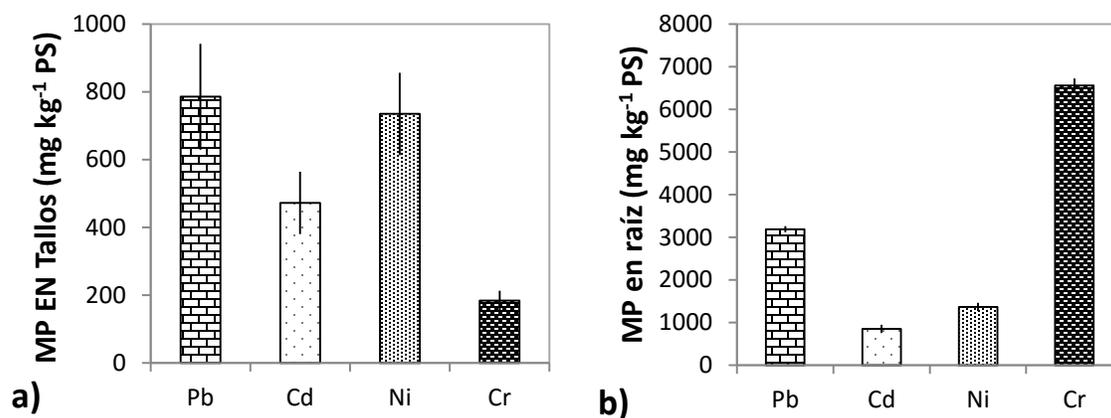


Fig. 7. Bioacumulación de metales pesados en a) tallos, y b) raíces de *P. laevigata*. Las barras representan la desviación estándar (n=3).

En mezclas de 2 MP (Fig. 8a), el Ni es el metal con mayor acumulación en tallos en los diferentes tratamientos independientemente del metal con el que se encuentre de forma simultánea, alcanzando un valor de hasta 1005 mg/kg. Este es un valor que supera a la absorción en los tallos de las plántulas, creciendo en medios con Ni de forma individual. El Ni es un elemento esencial para el metabolismo de las plantas, aun cuando estas requieren menos de 0.001 mg/kg de peso seco (Mahler, 2003). Mientras que el plomo es el metal con menor acumulación, y el Cr en presencia de Pb, disminuye su acumulación en el tallo. En algunas especies vegetales, la acumulación de Pb tiende a incrementarse rápidamente en los órganos, a medida que se aumenta las dosis en el suelo hasta niveles menores a 1000 mg/kg de Pb en suelo, las plantas no siempre lo toleran y mueren (Rodríguez, et al., 2006). El orden de acumulación fue de la siguiente manera Ni>>Cd≥Cr>>Pb.

En la raíz se observa una tendencia de mayor acumulación de MP, respecto al tallo en todos los tratamientos (Fig. 8b). Siendo el Cr el metal que presenta mayor contenido, incluso

de hasta 6898 mg/kg, el cual es un valor superior a comparación del Cr en forma individual, sin embargo, se observa que en presencia de Pb disminuye significativamente su absorción lo cual ocurrió también en los tallos. Mientras que el Pb es el metal menos acumulado incluso con valores menores que estando de forma individual, lo que coincide con el comportamiento en tallos. En algunas plantas el Pb es capaz de acumularse principalmente en las raíces siendo mínima su presencia en otras partes u órganos de los cultivos (Kabata-Pendias, 2000); aunque algunos otros autores han reportado trazas de este elemento incluso en granos de cebada (López, et al., 2005). El orden de acumulación fue el siguiente $Cr >> Cd \geq Ni \geq Pb$.

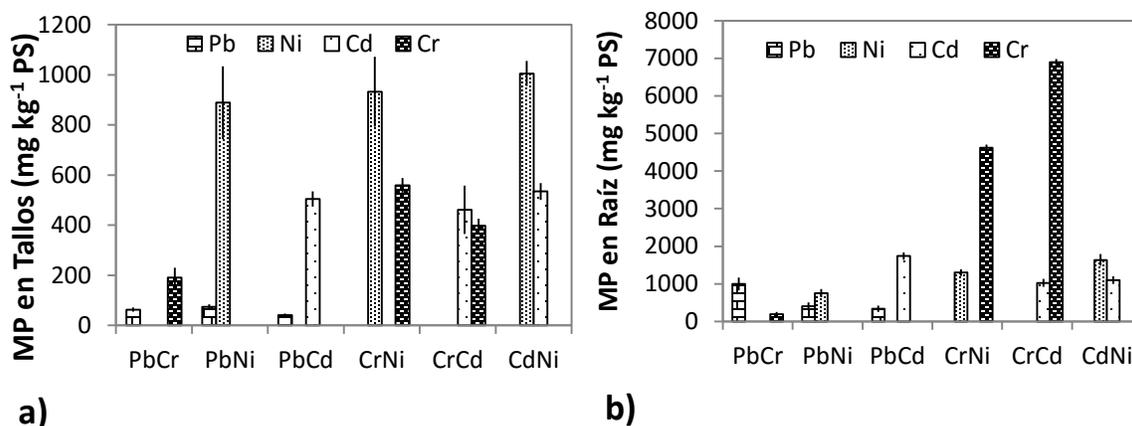


Fig. 8. Bioacumulación de los Metales Pesados en a) tallos y b) raíces de *P. laevigata*, en mezclas de dos metales pesados. Las barras representan la desviación estándar (n=3).

Respecto a la exposición, de las plántulas, a tres metales pesados, en tallos se acumuló el Cr en mayor cantidad, hasta 1009 mg/kg, el cual es mayor que estando en mezcla de 2 MP y mayor que de forma individual, estando en presencia de Ni y Cd, mientras que en presencia de Pb disminuye significativamente su absorción (Fig. 9 a). El Ni también se acumuló en gran cantidad estando en combinación, sin embargo en presencia de Pb y Cd disminuye significativamente su acumulación.

En cuanto a las raíces, como se registró de forma individual y en presencia de la mezcla de 2 metales, cuando hay 3 MP, siguen teniendo mayor acumulación en comparación a la acumulación observada en tallos. El Cr es el metal con la significativamente mayor acumulación, hasta 5792 mg/kg, valor similar al registrado con 1 y 2 MP. Mientras que en

tallos la concentración de Cr si es mayor con 3MP que estando expuesto a 1 MP y a la mezcla de 2 MP (Fig. 9 b). El orden de acumulación es $Cr \gg Ni \geq Cd \geq Pb$.

James y Bartlett (1984), observaron que la reducción de Cr(VI), seguido de la acomplejación del recién formado Cr(III) en la zona radical, puede aumentar la absorción y translocación de Cr en raíces y tallos de poroto (*Phaseolus sp.*) y maíz (*Zea mays L.*).

El Cr(VI) es la forma más biodisponible y tóxica (pero inestable) para las plantas en el suelo. El Cr(VI) aumenta su solubilidad en rangos de pH 5.5 y 8 (James, 2002).

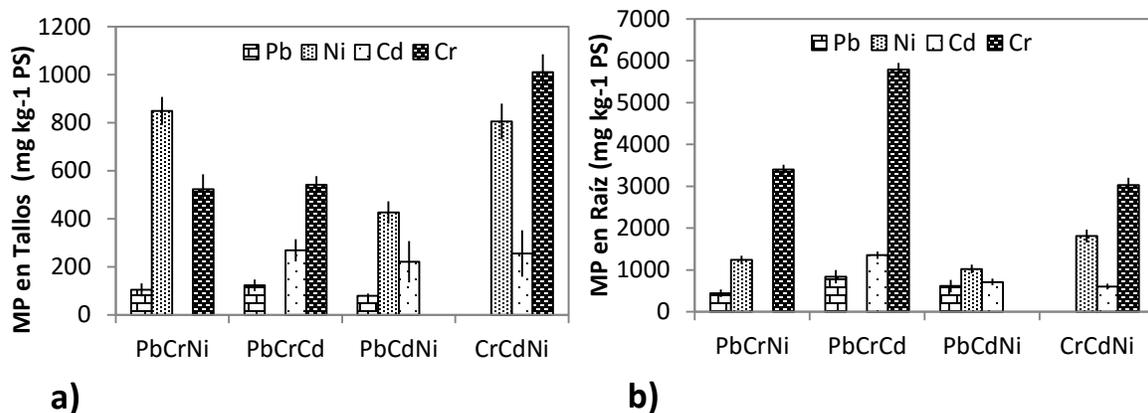


Fig. 9. Bioacumulación de los Metales Pesados en a) tallos y b) raíces de *P. laevigata*, en mezclas de tres metales pesados. Las barras representan la desviación estándar (n=3).

Respecto a la mezcla de los 4 MP en tallos (Fig. 10a), el Ni fue el metal con la significativamente mayor acumulación, independientemente de la presencia o ausencia de EDTA en el medio de cultivo formulado (564 y 545 mg/kg, respectivamente), sin embargo, su absorción es menor que estando individualmente y en mezcla de 2 y 3 MP. Mientras que el Pb fue el metal menos acumulado, generándose el siguiente orden de acumulación $Ni \gg Cd \geq Cr > Pb$.

El Ni, puede llegar a ser uno de los metales menos adsorbidos en suelos, y ser fácilmente absorbido por las plantas y ser ligeramente tóxico para las mismas: Siendo un elemento móvil en los tejidos de las plantas, se acumulan preferiblemente en las hojas y en las semillas (Moral, et al., 1994).

En cuanto a las raíces expuestas a 4 MP de forma simultánea y en presencia de EDTA, la concentración de MP fue mucho mayor que en tallos y que en todos los tratamientos con 1MP, 2MP, 3MP y 4MP sin EDTA. El Cr fue el metal que se acumuló en mayor proporción (hasta 96,666 mg/kg), un valor muy superior al registrado en todos los tratamientos evaluados. Mientras que la preferencia de acumulación observada en 4MP con y sin EDTA, siguió el mismo orden $Cr \gg Ni \gg Pb \gg Cd$ (Fig. 10b).

En conclusión, el uso de EDTA en cultivos *in vitro* de plántulas de *P. laevigata*, no tiene influencia en la acumulación en los tallos, pero si a nivel de raíz, aumentando 61, 39, 23 y 3 veces el contenido de Cr, Ni, Pb y Cd, respectivamente.

La reducción del Cr(VI) se acelera enormemente por la adición de EDTA y de otros quelantes que puedan competir con la oxidación del metal, incluyendo al ion amonio (Prairie, et al., 1992).

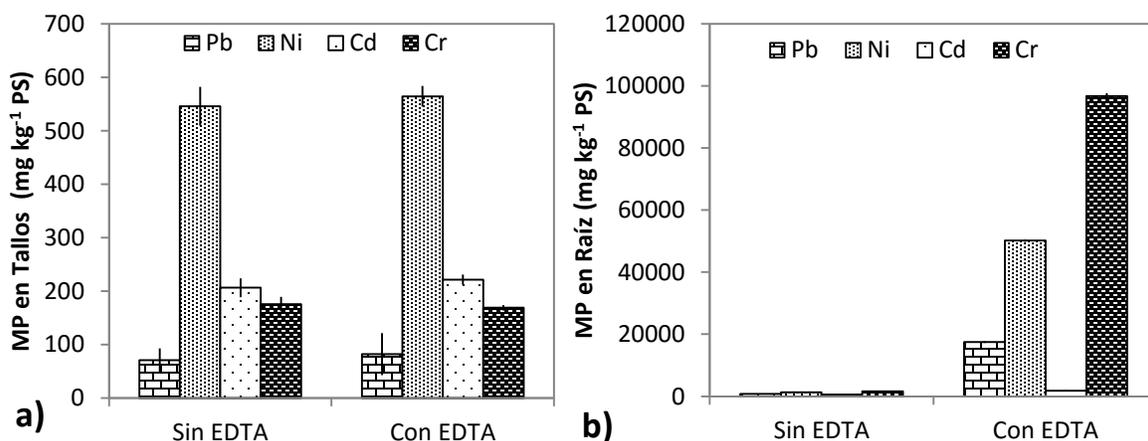


Fig. 10. Bioacumulación de los Metales Pesados en a) tallos y b) raíces de *P. laevigata*, en presencia de los 4 MP, con y sin la adición de EDTA. Las barras representan la desviación estándar (n=3).

7.5 Parámetros de bioconcentración

Las plántulas fueron expuestas a 50 mg/L de cada metal en el medio, se observa que el Pb y Ni tuvieron significativamente un mayor factor de bioconcentración (FB), $FB=15.7$ y $FB=14.6$, respectivamente. Mientras que el Cr mostró el menor FB. Respecto a la capacidad de translocar el metal a los tejidos aéreos, medido como el factor de translocación (FT), el Cd ($FT=0.55$) y Ni ($FT=0.53$) registraron el significativamente mayor valor. Sin embargo, en

el caso del Pb se observa que puede bioacumular gran cantidad de metal pero no translocarla y, el Cr es absorbido y translocado en menor grado (Fig. 11b).

Los factores de bioconcentración o bioacumulación y translocación indican que especies de plantas pueden ser consideradas acumuladoras, tolerantes o excluseras de los elementos de interés. Las plantas con FB y FT mayor a 1 son considerados como acumuladoras o hiperacumuladoras (si las concentraciones exceden 0.1%), las que representan valores entre 0.1 y 1, respectivamente, son consideradas como tolerantes y las que presentan valores < 0.1 se consideran como plantas excluseras (Mendieta & Taisigue, 2014).

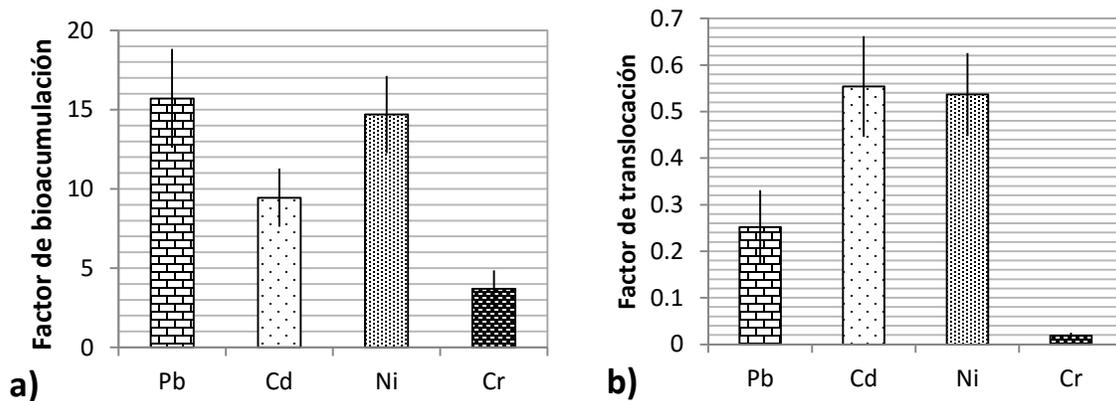


Fig. 11. Resultados de parámetros de bioconcentración; a) FB y b) FT de *P. laevigata*, en presencia de metales pesados de forma individual. Las barras representan la desviación estándar (n=3).

Respecto a las mezclas de 2 MP, las plántulas mostraron con el Ni el significativo mayor FB (hasta 20.7), pero disminuye cuando se encuentra en presencia de Pb. De igual forma, muestra el significativamente mayor FT (0.96), el cual disminuye estando en mezcla con Cd (Fig. 12 a, b), pero es mayor que estando el Ni de forma individual. Mientras que Pb y el Cr son los metales con menor FB, lo que coincide con su comportamiento estando de forma individual. Debido a que en los suelos contaminados con Pb se suele encontrar también Cd y Zn (Hettiararchi & Pierzynski, 2002) por analogía entre sus propiedades y características metálicas algo similar a lo que ocurre para la triada de Fe-Ni-Co. En estos casos la barrera suelo-planta limita la translocación de Pb a la cadena alimenticia, ya sea por procesos de inmovilización química en el suelo según se ha reportado (Laperche, et al., 1997) o limitando

el crecimiento de la planta antes de que el Pb absorbido alcance valores que puedan ser dañinos al ser humano.

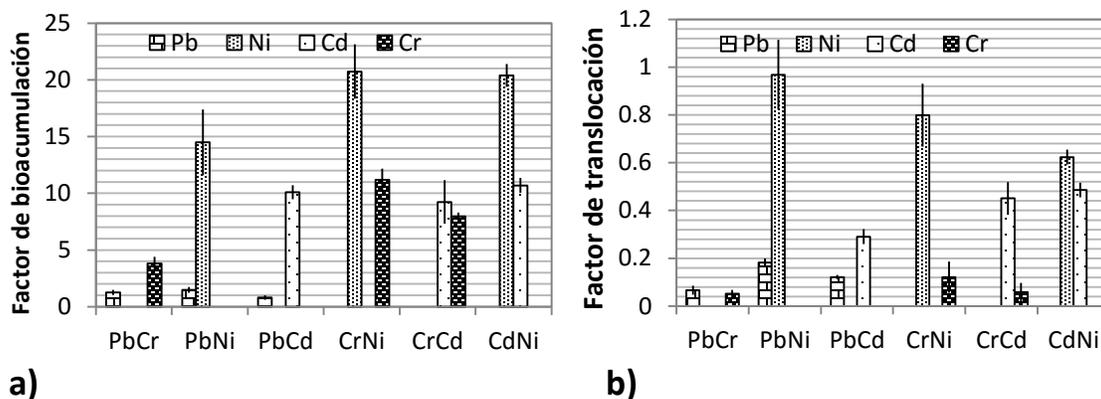


Fig. 12. Resultados de parámetros de bioconcentración; a) FB y b) FT de *P. laevigata*, en mezcla de dos metales pesados. Las barras representan la desviación estándar (n=3).

En mezclas de 3 MP, el factor de bioacumulación fue significativamente mayor en Cr (FB=20.1) y Ni (FB=16.9), incluso mayor que estando en la mezcla de 2 MP y de forma individual. Sin embargo, al estar en presencia de PbCd disminuye significativamente su FB (Fig. 13 a).

Por otro lado, el FT fue significativamente mayor con el metal Ni, en combinación con PbCr (más que el Ni en forma individual pero menor que en mezcla de 2 MP), pero disminuye considerablemente estando en mezclas con PbCd y CrCd (Fig. 13 b), lo cual indica que las plántulas de *P. laevigata* tienen la capacidad de translocar una cantidad considerable del Ni que bioacumulan. Mientras que del Cr que pueden bioconcentrar solo translocan muy poco, pero su valor es superior que estando de forma individual y en mezcla de 2 MP.

La translocación de las raíces a los brotes se produce a alta velocidad debido a que el transporte de metal es estimulado por la influencia dentro de la raíz y células de la hoja, y la carga del metal en el xilema. La acumulación de metal en plantas puede estar influenciada por muchos procesos, por ejemplo la movilización del metal y la absorción de los suelos, compartimentación y secuestro dentro de la raíz, eficiencia del xilema de cargar y transportar el metal, distribución del metal a las partes aéreas, el secuestro y almacenamiento en las células de las hojas (Clemens, et al., 2002).

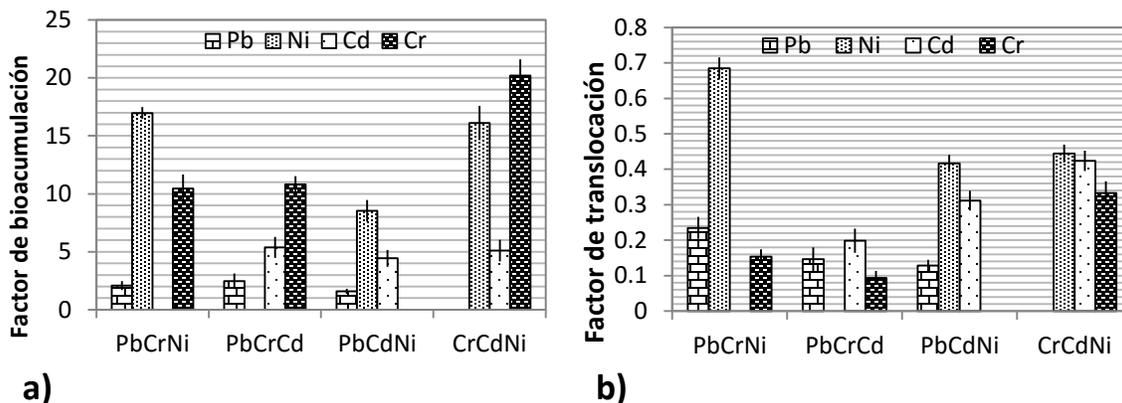


Fig. 13. Resultados de parámetros de bioconcentración; a) FB y b) FT de *P. laevigata*, en presencia de tres metales pesados. Las barras representan la desviación estándar (n=3).

En el caso de 4 MP, se observa que el FB fue significativamente mayor con el Ni, con y sin la adición de EDTA (11.2 y 10.9, respectivamente), lo cual indica que la adición de este quelante no afecta significativamente el factor. Sin embargo, el FB es menor comparado a los valores alcanzados por el Ni estando de forma individual o en mezclas de 2 y 3 MP. Mientras que el Pb es el metal con menor FB (Fig. 14a).

En cuanto al FT, este es significativamente mayor para todos los metales sin la adición de EDTA, siendo el Ni y Cd los metales con significativamente mayor FT (0.42 y 0.36, respectivamente), mientras que el Cr y Pb poseen los FT significativamente menores. Mientras que con la adición del EDTA, se observa una disminución significativa de los FT para todos los MP, siendo el Cd, el metal menos afectado (Fig. 14 b). El EDTA es efectivo para facilitar la extracción de metales, pero en general se ha observado que la aplicación de más de 1g/kg de EDTA (~2.7 mM) se vuelve ineficiente, y se corre el riesgo de que aumente la cantidad de metales lixiviados y las plantas mueran (Schmidt, 2003).

El transporte a través de la membrana celular en las células de la raíz es un proceso que inicia con la absorción de metales en los tejidos de la planta. Para el proceso de fitoextracción, cantidades sustanciales de MP se deben absorber por la raíz de su medio circundante, seguido de su translocación a las partes cosechables de la planta, para que puedan ser eliminados completamente del sitio contaminado (Zayed & Terry, 2003).

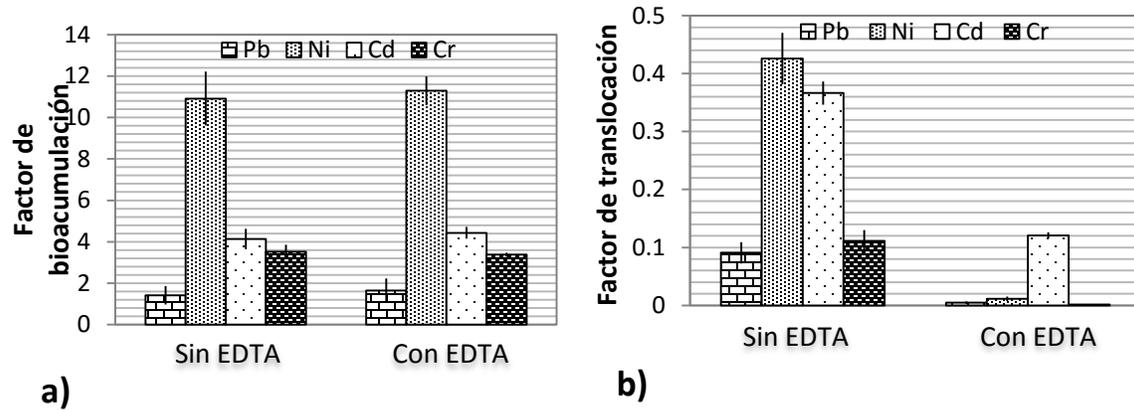


Fig. 14. Resultados de parámetros de bioconcentración; a) FB y b) FT de *P. laevigata*, con 4 metales pesados, con y sin la adición de EDTA. Las barras representan la desviación estándar (n=3).

Capítulo 8

Conclusiones

- Se establecieron cultivos asépticos de semillas de *Prosopis laevigata* por su exposición a hipoclorito de sodio (1.2% por 30 minutos). Las cuales fueron capaces de germinar bajo todos los tratamientos de estrés por los metales pesados evaluados. Sin embargo, la sobrevivencia disminuyó al incrementar el número de MP incluidos en el medio de cultivo. Respecto al crecimiento, como medida de tolerancia de las plántulas expuestas a los MP, se vio afectado, con excepción de las plántulas expuestas a Pb. Por otro lado, la acumulación de los MP en los tejidos de las plántulas fue mayor en raíces que en tallos, siendo el Pb el metal mayormente acumulado en tallos de forma individual, pero al estar en mezclas de 2, 3 y 4 MP, la preferencia de acumulación fue por el Ni; mientras que en raíces, el Cr fue el MP con la significativamente mayor acumulación sin importar la presencia de otros metales. Los factores de bioconcentración determinados para los MP de forma individual o en mezclas hasta de 4MP, siempre fue mayor a uno. Mientras que el FT registrado fue menor a uno para todos los MP, siendo el Ni el metal con mayor capacidad de traslocarse independiente del número de metales presentes (≥ 0.42). *Prosopis laevigata*, es capaz de bioacumular gran cantidad de MP, incluso puede ser clasificada como acumuladora de múltiples metales de forma simultánea. Por lo que es una candidata adecuada a emplearse en proyectos de recuperación de zonas contaminadas con metales pesados. Sin embargo, en vida silvestre, la planta puede ser consumida por el ganado, por lo que existe un riesgo potencial de contaminar la cadena trófica.

Capítulo 9

Perspectivas

- Evaluar la capacidad de acumulación de metales pesados en tejidos de *P. laevigata*, *in vivo*.
- Evaluar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de ácidos orgánicos, en la acumulación de metales pesados en los tejidos de *P. laevigata*.
- Evaluar la adición de EDTA a tratamientos de metal de forma individual.

Capítulo 10

Agradecimientos

Al PROMEP por la beca otorgada y apoyo financiero durante la realización de este proyecto.

A mis padres por brindarme su apoyo incondicional durante toda mi formación académica, ya que siempre me han motivado a perseguir mis anhelos.

A mis hermanos y sobrinos por su cariño, consejos y motivación para no dejarme vencer.

A la Dra. Leticia Buendía González y al Dr. Juan Orozco Villafuerte, por su gran apoyo y dedicación durante toda la realización de este trabajo.

A mis amigos, quienes me apoyaron en la realización de este trabajo y siempre me motivaron a concluirlo.

Capítulo 11

Referencias

1. Abollino, O. y otros, 2002. Distribution and Mobility of Metals in Contaminated Sites. En: *Chemometric Investigation of Pollutant Profiles*. s.l.:Environmental Pollution, pp. 119-177.
2. Acevedo, E., 2006. Resistance to abiotic stresses. *Plant Breeding: Principles and Prospect*, pp. 406-418.
3. Ademorati, C., 1996. Soil water and air, Environmental chemistry and toxicology. *Foludex, Ibadan*, pp. 30-34.
4. Adriano, D., 2001. Trace elements in terrestrial environments. En: *Biogeochemistry, Bioavailability and Risk of Metals*. New York: Springer-Verlag, p. 867.
5. Angelova, V., Ivanova, R., Delibaltova, V. & Ivanov, K., 2004. Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Industrial Crops and Products*, pp. 197-205.
6. Antúnez, I., Retamosa, E. & Villar, R., 2001. Relative growth rate in phylogenetically related deciduous and evergreen woody species. *Oecologia*, pp. 172-180.
7. Baker, A.J.M. 1981. Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutrition* 3:643-654.
8. Banerjee, G. & Sarker, S., 1997. The role of *Salvinia rotundifolia* in scavenging aquatic Pb (II) pollution: a case study. *Bioprocess Engineering*, pp. 295-300.
9. Barbier, O., 2009. Insuficiencia Renal por Metales Pesados. *Bioquímica*, p. 1.
10. Barceló, J. & Poschenrieder, C., 2003. Phytoremediation: principles and perspectives. *Contrib Sci*, pp. 333-344.
11. Boularbaha, A. y otros, 2006. *Chemosphere*. pp. 811-817.
12. Buendía-González, L. y otros, 2011. Somatic embryogenesis of the heavy metal accumulator *Prosopis laevigata*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, pp. 1-10.
13. Buendía-González, L. O.-V. J., Estrada-Zúñiga, C., Barrera-Díaz, E. & CRuz-Sosa, F., 2010 b. In vitro LEAD AND NICKEL ACCUMULATION IN MESQUITE (*Prosopis laevigata*) SEEDLINGS. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 9(1), pp. 1-9.

14. Buendía-González, L. O.-V. J., Estrada-Zúñiga, C., Barrera-Díaz, E. & CRuz-Sosa, F., 2010. In vitro LEAD AND NICKEL ACCUMULATION IN MESQUITE (*Prosopis laevigata*) SEEDLINGS. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 9(1), pp. 1-9.
15. Buendía-González, L. y otros, 2010 a. *Prosopis laevigata* a potential chromium (VI) and cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. *Bioresource Technology*, pp. 5862-5867.
16. Buendía-González, L. y otros, 2010. *Prosopis laevigata* a potential chromium (VI) and cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. *Bioresource Technology*, pp. 5862-5867.
17. Buendía-González, L. y otros, 2009. *Prosopis laevigata* a Chromium (VI) and Cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. *Bioresource Technology*.
18. Buendía-González, L. y otros, 2010. *Prosopis laevigata* a Chromium (VI) and Cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. *Bioresource Technology*.
19. C. Villas, R., Echavarría, C., Ellis, J. & Masera, D., 2004. *Problemas Emergenciales y Soluciones APELL*. Bolivia: CYTED.
20. Camacho, M., 1994. Dormición de semillas, causas y efectos. En: México: Editorial Trillas, p. 125.
21. Carrillo-Castañeda, G. y otros, 2002. Alfalfa growth promotion by bacteria grown under iron limiting conditions. *Bioresource Technology*, pp. 391-399.
22. Caussy, D. y otros, 2003. Lessons from case studies of metals: investigating exposure, bioavailability, and risk. En: *Ecotoxicol Environ Saf.* s.l.:s.n., pp. 45-51.
23. Cedillo, v. & Mayoral, P., 1997. "Prosopis laevigata". *FAO. RCL. AGROFORESTERIA EN ZONAS ÁRIDAS. México*, p. 5.
24. Chatterjee, J. & Chatterjee, C., 2000. Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environmental Pollution*, pp. 69-74.
25. Chaudry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S. & Joner, E., 2005. Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environ Sci Pollut Res*, pp. 34-48.
26. Christophe Barbier, O., 2009. Insuficiencia Renal por Metales Pesados. *Bioquímica*, p. 1.
27. Clavijo, J., 1989. Análisis de crecimiento en malezas. *Revista Comaffi*, pp. 12-16.
28. Clemens, S., Palmgrem, M. & Kramer, U., 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci*, pp. 309-315.

29. Csuros, M. & Csuros, C., 2002. Environmental sampling and analysis for metals. *Lewis Publisher*, p. 372.
30. Das, P., Smantaray, S. & Rout, G., 1998. Studies on cadmium toxicity in plants: A review. *Environmental Pollution*, pp. 29-36.
31. Delgadillo, A., 2011. Fitorremediación: Una alternativa para eliminar la contaminación.. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, pp. 597-612.
32. Delgadillo, A. y otros, 2011. Fitorremediación: Una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* , p. 605.
33. Delgadillo-López, A. y otros, 2011. Fitorremediación: Una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, pp. 598-602.
34. Doran, P. M., 2009. Application of Plant Tissue Cultures in Phytoremediation Research: Incentives and Limitations. *School of Biological Sciences and Department of Chemical Engineering, Monash University*, pp. 60-73.
35. Doty, S., 2008. Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytol*, pp. 318-333.
36. García-Aguilera, E., Martínez-Jaime, S. & Frías-Hernández, J., 2000. Escarificación Biológica del Mezquite (*Prosopis laevigata*) con diferentes especies de ganado doméstico.. *Universidad de Guanajuato*, pp. 117-123.
37. García, I. & Dorronsoro, C., 2002. Contaminación por metales pesados. *Departamento de edafología y química agrícola de España*.
38. García, I. & Dorronsoro, C., 2005. Contaminación por Metales Pesados. en Tecnología de Suelos. *Universidad de Granada. Departamento de Edafología y Química Agrícola*.
39. George, E. & Klerk, G., 2008. The components of plant tissue culture media I: macro and micro-nutrients. . En: *Plant propagation by tissue culture*. The Netherlands: Springer, pp. 65-113.
40. Gutiérrez, M., 2003. *Minería Unión de Grupos Ambientalistas (UGAM)*. [En línea] Available at: <http://www.union.org.mx/guia/actividadesyagravios/mineria.htm>.
41. Hall, J., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, pp. 19-42.
42. Haqqani, A. & Pandey, R., 1994. Response of mung bean to water stress and irrigation at various growth stages and plant densities: I. Plant and crop growth parameters. *Trop. Agrom.*, pp. 281-288.

43. Hettiararchchi, G. & Pierzynski, G., 2002. In situ stabilization of soil lead using phosphorus and manganese oxide: Influence of plant growth. *Journal Environmental Quality*, pp. 564-573.
44. INE, 1994. Mezquite *Prosopis* spp. Cultivo alternativo para zonas áridas y semiáridas de México. *Comisión Nacional de Zonas Áridas. México, D.F.*, p. 18.
45. INE, 2007. *Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático*. [En línea] Available at: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/72/descrip.html> [Último acceso: 15 Mayo 2013].
46. Intawongse, M. & Deam, J., 2006. Uptake of heavy metals by vegetable plants grown on contaminated soil and their bioavailability in the human gastrointestinal tract. *Food Additives and Contaminants*, pp. 36-48.
47. James, B., 2002. Chemical transformations of chromium in soils: Relevance to mobility, bio-availability and remediation.
48. James, B., 2002. Chemical transformations of chromium in soils: Relevance to mobility, bio-availability and remediaton.
49. James, B. & Bartlett, R., 1984. Plant-soil enteractions of chromium. *J. Environ. Qual.*, pp. 67-70.
50. Juárez, J., Alvarado, M. & Valdez, R., 2001. Escarificación de semillas de mezquite (*Prosopis laevigata*) para aumentar la eficiencia en la germinación. *Universidad Autónoma de Zacatecas*, pp. 1-8.
51. Kabata-Pendias, A., 2000. Trace elements in soils and plants. En: *CRC Press, Inc. Boca Raton. USA*: s.n., pp. 365-413.
52. Kabata-Pendias, A. & Pendias, H., 2001. Trace elements in soils and plants. p. 413.
53. Kelley, C., Gaither, K., Baca-Spry, A. & Cruickshank, B., 2000. Incorporation of Phytoremediation strategies into the introductory chemistry laboratory. *Chem Educator*, pp. 140-143.
54. Kim, H., Song, B. & J., P., 2009. Distribution of trace metals at two abandoned mine sites in Korea and arsenic-associated health risk for the residents. En: *Nat Biotechnol.* s.l.:s.n., pp. 568-572.
55. Kru, G., 1997. Enviromental Influences on Development Growth and Yield. *The physiology of vegetable crops*, pp. 101-180.
56. Kumar, P., Dushenkov, V., Motto, H. & Raskin, I., 1995. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science & Technology*, pp. 1239-1245.

57. Labra-Cardón, D., Guerrero-Zúñiga, L. & Rodríguez.Tovar, A., 2012. Respuesta de crecimiento y tolerancia a metales pesados de *Cyperus elegans* y *Echinochloa polystachya* inoculadas con una rizobacteria aislada de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Int. Contam. Ambie.*, pp. 7-16.
58. Laperche, V., Logan, T., Gaddam, P. & Traina, S., 1997. Effect of apatite amendment on plant uptake of Pb from contaminated soil. *Environmental Science Technology*, pp. 2745-2753.
59. Laurent, F., Canlet, C., Debrauwer, L. & Pascal-Lorber, S., 2007. Metabolic fate of C-2,4-dichlorophenol in tobacco cell suspension cultures. *Environ Toxicol Chem*, pp. 2299-2307.
60. López, P. y otros, 2005. Evaluación de la calidad física de diferentes variedades de cebada (*hordeum sativum* jess) cultivadas en los estados de Hidalgo y Tlaxcala, México. *Revista Chilena de Nutrición*, pp. 247-253.
61. Lucero, M. y otros, 1999. Tolerance to nitrogenous explosives and metabolism of TNT bt cell suspensions of *Datura innoxia*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, pp. 480-486.
62. Lucho, C. y otros, 2005a. A multivariate analysis of the accumulation and fractionation of major and trace elements in agricultural soils in Hidalgo State, México irrigated with raw wastewater. *Environmental International*.
63. Mahler, R., 2003. *General overview of nutrition for field and container crops*. Springfield: Proc. RMRS-P-33.
64. Maldonado, L. & De la Garza, P., 2000. El Mezquite en Mpxico; Rasgos de Importancia Productiva y Necesidades de Desarrollo. En: *El Mezquite Árbol de Usos Múltiples*. México: Universidad de Guanajuato, pp. 37-50.
65. Mendieta, B. & Taisigue, K., 2014. Acumulación y traslocación de metales, metaloides y no metales en plantas nativas de la zona minera de Chontales: Implicaciones para el potencial de firo-remeciación. *Laboratorio de Biotecnología, UNAM-Managua*, pp. 1-12.
66. Moral, R. y otros, 1994. Distribution and accumulation of heavy metals (Cd, Ni and Cr) in tomato plant. *Fresenius Environmental Bulletin*, pp. 395-399.
67. Moutschen, J., 1985. Introduction to genetic toxicology. En: *Wiley Interscience*. New York: s.n.
68. Muchuwei, M. y otros, 2006. Heavy metals content of vegetables irrigated with mixtures of wastewater and sewage sludge in Zimbabwe: implications for human health. *Agriculture ecosystems & environment*, pp. 41-48.

69. Navarro-Aviñó, J., Aguilar-Alonso, I. & López-Moya, J., 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, pp. 10-25.
70. Nies, D. H., 1999. Microbial heavy-metal resistance.. *Applied Microbiology and Biotechnology*., pp. 730-750.
71. Nikolaeva, G., 1969. Physiology of seed dormancy in sedes. *Trad. Shapiro S. IPST. Press*, p. 220.
72. Paris, C., Hadad, H., Maine, M. A. & Suñe, N., 2005. Eficiencia de dos macrófitas flotantes libres en la absorción de metales pesados. *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina*, pp. 237-243.
73. Peer, W. y otros, 2005. Phytoremediation and hyperaccumulator plants. En: *Topics in Current Genetics: Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 299-340.
74. Peralta, J., 2001. Uptake and effects of five heavy metals on seed germination and plants growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, pp. 727-734.
75. Pilon, E., 2005. Phytoremediation. *Biology Department*, p. 31.
76. Prairie, M., Evans, L. & Martínez, S., 1992. Chem. Oxid. pp. 428-441.
77. Rodríguez, O. y otros, 2006. Capacidad de seis especies vegetales para acumular plomo en suelos contaminados. *Revista Fitotecnia Mexicana*, pp. 239-245.
78. Rodríguez, R. & García-Cortés, A., 2006. Fitorremediación. En: *Los residuos minero-metalúrgicos en el medioambiente*. Madrid: Instituto Geológico y Minero de España, pp. 535-554.
79. Rolston, M., 1978. Water impermeable seed dormancy. *The Bot*, Volumen 4, pp. 365-396.
80. Ruiz, D., 2011. Uso potencial de la vaina de mezquite para la alimentación de animales domésticos del Altiplano potosino. *Universidad Autónoma de San Luis Potosí* , pp. 1-114.
81. Ruiz, D., 2011. Uso potencial de la vaina de mezquite para la alimentación de animales domésticos del Altiplano Potosino. *Universidad Autónoma de San Luis Potosí*, pp. 18-19.
82. Ruiz, D., 2011. USO POTENCIAL DE LA VAINA DE MEZQUITE PARA LA ALIMENTACIÓN DE ANIMALES DOMÉSTICOS DEL ALTIPLANO POTOSINO. *UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ*, pp. 18-19.

83. Ruiz-Huerta, E. A. & Armienta-Hernández, M. A., 2012. Acumulación de arsénico y metales pesados en maíz en suelos cercanos a jales o residuos mineros. *Int. Contam. Ambie.*, pp. 103-117.
84. Santiago-Cruz, M. y otros, 2014. Exploring the Cr (VI) Phytoremediation Potential of *Cosmos bipinnatus*. En: *Water Air Soil Pollut.* s.l.:Springer, pp. 1-8.
85. Schmidt, U., 2003. Enhancing Phytoextraction: The effect of chemical soil manipulation on mobility, plant accumulation, and leaching of heavy metals. *Journal of Environmental Quality*, pp. 1939-1954.
86. Schnoor, J. y otros, 1995. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. En: *Environ. Sci. Thechnol.* s.l.:s.n., pp. 318-323.
87. Segura, J., Jiménez-Rubio, A., Llamas, R. & Jiménez-Planas, A., 1997. El ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) y su uso en oncodoncia. pp. 90-97.
88. Semarnap/PROFEPA, 1998. *Informe Triannual, 1995-1997*, México: s.n.
89. SEMARNAP, 2000. Identificación y Caracterización de Sitios Contaminados con Residuos Peligrosos. *INE*, p. 19.
90. SEMARNAT, 2004. Dirección General de gestión Integral de Materiales y Actividades Riesgosas. *INE, México*.
91. Sobrevilla-Solís, J., López-Herrera, M., López-Escamilla, A. & Romero-Bautista, L., 2013. Evaluación de diferentes tratamientos pregerminativos y osmóticos en la germinación de semillas *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Wild) M.C. Johnston. *Estudios científicos en el Estado de Hidalgo*, Volumen II, pp. 83-95.
92. USEPA, 2001. Treatment Technologies for Site Cleanup: Annual Status Report. *Office of Solid Waste and Emergency Response*.
93. Velasco, J. A., De la Rosa, D. a., Solórzano, G. & Volke, T., 2004. Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. *Dirección General del Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental*, pp. 2-4.
94. Villas, R., Echavarría, C., Ellis, J. & Masera, D., 2004. *Problemas Emergenciales y Soluciones APELL*. Bolivia: CYTED.
95. Volke-Sepúlveda, T., Velasco-Trejo, J. & De la Rosa-Perez, D., 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. *Instituto Nacional de Ecología-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (INE-SEMARNAT)*, p. 141.
96. Volke, T., Velasco, J., De la rosa, D. & Solórzano, G., 2004. EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS DE REMEDIACIÓN PARA SUELOS CONTAMINADOS CON METALES. *INE*, pp. 1-46.

97. Watanabe, T. y otros, 2000. Background lead and cadmium exposure of adult women in Xian City and two farming villages in -shaaxi Province, China. *Sci Total Environ*, pp. 1-13.
98. WHO, 1988. Chromium. *Environmental health criteria*, p. 61.
99. WHO, 1995. Inorganic lead. *Environmental health criteria*, p. 165.
100. Zayed, A. & Terry, N., 2003. Chromium in the environment: factors affecting biological remediation.. *Plant and Soil*, pp. 139-156.

Capítulo 12

Constancias y anexos



La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A.C.

“La Ingeniería Química en la Biotecnología y la Energía”

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

Elodia Rodríguez-Galindo, Juan Orozco-Villafuerte, María Elena Estrada-Zúñiga,
Francisco Cruz-Sosa, Eduardo Jaime Vernon-Carter, Leticia Buendía-González

Por la presentación del trabajo:

“Crecimiento y tolerancia a múltiples metales pesados por *Prosopis laevigata*”

ID: 167

XXXIV Encuentro Nacional y III Congreso Internacional de la AMIDIQ
llevado a cabo del 7 al 10 de mayo de 2013 en el Puerto de Mazatlán, Sinaloa, México.

Dr. Rubén González Nuñez
PRESIDENTE DE AMIDIQ

Dr. Jesús Alberto Ochoa Tapia
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO

Dr. Jorge Milán Carrillo
PRESIDENTE DEL COMITÉ ORGANIZADOR



La Universidad Autónoma de Ciudad Juárez y la
Academia Nacional de Ciencias Ambientales



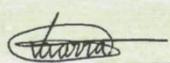
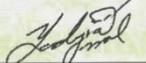
Otorgan la presente

Reconocimiento

A: **Elodia Rodríguez Galindo*, Juan Orozco Villafuerte, Ma Elena Estrada Zúñiga, Edgar Villagrán Vargas, Leticia Buendía González**

Por su participación con la ponencia: **TOLERANCIA SIMULTÁNEA A 4 METALES PESADOS POR PLÁNTULAS DE *Prosopis laevigata***, en la modalidad de **Cartel** del área temática **Tecnología y Biotecnología Ambiental**, en el marco del **XII Congreso Internacional y XVIII Congreso Nacional de Ciencias Ambientales: "La tierra es nuestra casa, cuidémosla"**, los días 5 al 7 de junio, en el Centro de Convenciones Cibeles.

Ciudad Juárez, Chihuahua, México, a junio de 2013.

 Lic. Ricardo Duarte Jáquez Rector Universidad Autónoma de Ciudad Juárez	 Dra. Guadalupe Ibarra Ceceña Presidenta Academia Nacional de Ciencias Ambientales	 Dra. Alba Yadira Corral Avitia Secretaria Academia Nacional de Ciencias Ambientales	 Mtra. Katya Aimeé Carrasco Urrutia Tesorera Academia Nacional de Ciencias Ambientales
--	--	--	--

