

EVALUACIONES ECOTOXICOLÓGICAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y POSGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

Dr. Víctor Job Paredes Cuahquentzi
Rector

Mtro. René Elizalde Salazar
Secretario Académico

EOF. Dora Juárez Ortiz
Secretaria de Investigación Científica y Posgrado

Mtro. Efraín Ortiz Linares
Secretario de Extensión Universitaria y Difusión Cultural

Dr. Sergio Eduardo Algarra Cerezo
Secretario Técnico

Mtro. Rubén Reyes Córdoba
Secretario Administrativo

Lic. Mauro Sánchez Ibarra
Secretario de Autorrealización

MAR. Adolfo Cuevas Sánchez
Coordinador de la División de Ciencias Biológicas

Dra. Madaí Angélica Gómez Camarillo
Coordinadora del Centro de Investigación en Genética y Ambiente

EVALUACIONES ECOTOXICOLÓGICAS

**Trabajo realizado por el
Cuerpo Académico de Ciencias Ambientales
UATLx-CA-39**

**Edelmira García Nieto
Libertad Juárez Santacruz
Elizabeth García Gallegos
Héctor Santos Luna Zendejas**



© 2013 Centro de Investigación en Genética y Ambiente
Universidad Autónoma de Tlaxcala
Av. Universidad No. 1
Calle del Bosque Col. Centro Tlaxcala, Tlax., C.P 90000
Tel/Fax 01(248) 48 155 00
Derechos reservados conforme a la ley
Primera edición
ISBN: 978-607-9348-32-8
Impreso en México

Cuidado de la edición: Libertad Juárez Santacruz y Edelmira García Nieto
Diseño editorial: Centro de Investigación en Genética y Ambiente
Diseño de portada: Edelmira García Nieto
Primera edición: Diciembre de 2013

Ejemplo de la manera correcta de citar cualquier capítulo de este libro:

García-Gallegos E. 2013. Variables de crecimiento, biomasa seca y pigmentos fotosintéticos como indicadores de fitotoxicidad. En: *Evaluaciones Ecotoxicológicas*. (García-Nieto *et al.*). Universidad Autónoma de Tlaxcala, México. p. 67-81.

La información publicada en los capítulos de este libro es responsabilidad del autor por lo que el contenido de los mismos no refleja necesariamente el punto de vista de la Institución.

ÍNDICE

	Página
Prefacio	9
<i>Rogelio Costilla Salazar</i>	
Agradecimientos	13
<i>Los autores</i>	
Capítulo 1.....	15
La Ecotoxicología desde una perspectiva holística en la evaluación integral de riesgo	
<i>Edelmira García Nieto</i>	
Capítulo 2.....	25
Muestreo en sitios contaminados, procesamiento y conservación de las muestras	
<i>Elizabeth García Gallegos</i>	
Capítulo 3.....	37
Tamizaje en sitios potencialmente contaminados: dioxinas en suelo y sedimento por ELISA	
<i>Edelmira García Nieto</i>	
Capítulo 4.....	67
Variables de crecimiento, biomasa seca y pigmentos fotosintéticos como indicadores de fitotoxicidad	
<i>Elizabeth García Gallegos</i>	
Capítulo 5.....	83
Vicia faba como bioindicador en ecogenotoxicología	
<i>Libertad Juárez Santacruz</i>	
Capítulo 6.....	101
Participación de los hongos micorrízicos arbusculares en la micorremediación	
<i>Héctor Santos Luna Zendejas</i>	
Glosario	121

PREFACIO

Cada región presenta características climatológicas, culturales y urbanas propias que influyen en la cantidad y calidad de sitios considerados potencialmente peligrosos debido a las sustancias nocivas que generan y emiten las actividades antrópicas, sin desprestigiar la contaminación natural, y que alteran el biotopo del ecosistema que repercute negativamente en la biocenosis y la interdependencia que existe entre los organismos.

Los sitios considerados potencialmente peligrosos generalmente presentan mezclas complejas de agentes químicos y diversidad de rutas de exposición que complican su evaluación. Para enfrentar la problemática de contaminación ambiental y evaluar los riesgos a la biota y a la salud humana, se requiere de grupos interdisciplinarios que interactúen para diagnosticar y buscar alternativas que orienten a la población afectada y a los tomadores de decisiones para reducir los riesgos y mejorar la calidad de vida.

La formación de recursos humanos enfocada a la evaluación integral de riesgo es una de las necesidades que enfrenta el estado y que la Universidad Autónoma de Tlaxcala, a través del Posgrado que ofrece el Centro de Investigación en Genética y Ambiente ha detectado, por lo que incluye dentro de su currícula unidades de aprendizaje con enfoque holístico de temas relacionados con la contaminación ambiental y el riesgo potencial, sustentadas dentro del modelo pedagógico humanista integrador basado en competencias (MHIC).

La experiencia de los docentes que imparten las asignaturas en el Posgrado considera pertinente describir detalladamente y con ilustraciones algunas técnicas básicas empleadas en estudios ecotoxicológicos con el enfoque integral que éstos requieren. Sin menoscabo ni pretensiones, este libro promete ser una valiosa herramienta como complemento de libros de textos, para fortalecer unidades de aprendizaje como Toxicología ambiental, Agroecología, Ecotoxicología y Evaluación integral de riesgo, cursos avanzados que se ofertan en la Maestría en Ciencias en Sistemas del Ambiente

y el Doctorado en Ciencias Ambientales, cuya finalidad es preparar a los estudiantes interesados en la problemática ambiental para abordar un escenario potencialmente peligroso de manera integral e interdisciplinaria. El libro puntualiza tres técnicas fundamentales en Evaluaciones ecotoxicológicas:

- Expone el inmunoensayo para la cuantificación de dioxinas en suelo y sedimento como una técnica de tamizaje o cribado para detectar sitios contaminados, que orienten al investigador en la selección de sitios y poblaciones que estén en riesgo potencial y requieran ser evaluadas.
- Muestra biomarcadores de efecto en plantas de interés agrícola, a nivel sistémico (biomasa seca), de sistemas (crecimiento de raíz), molecular (daño al DNA) y bioquímico (pigmentos fotosintéticos) y como herramientas para evaluar la toxicidad de mezclas complejas de agentes químicos presentes en matrices ambientales.
- Presenta la micorremediación como una opción relativamente nueva y prometedora para disminuir o inmovilizar los contaminantes del suelo, reducir la bioacumulación en plantas y la entrada de contaminantes a la cadena trófica, empleando los beneficios de los hongos micorrízicos arbusculares.

El objetivo principal del libro es aproximar al estudiante a las evaluaciones ecotoxicológicas de forma interdisciplinaria, sin embargo, la naturaleza del texto refleja la experiencia e interés académico de los autores:

Edelmira García Nieto; es Químico farmacobióloga de formación, con Maestría y Doctorado en Ciencias Biomédicas Básicas, su investigación se ha enfocado en el área de Toxicología ambiental, evaluando la contaminación de suelo y sedimento y el riesgo potencial que representan para los organismos, mediante la cuantificación de metales y compuestos orgánicos persistentes entre los que destacan las dioxinas, método inmunoenzimático que detalla en este libro.

Elizabeth García Gallegos; es Ingeniero Agrónomo, especialista en suelos de formación, con Maestría en Edafología y Doctorado en Ciencias Ambientales, su trabajo se

enfoca en evaluar la fertilidad del suelo y los efectos de los contaminantes presentes en él sobre las variables agronómicas de diversas especies de plantas de interés agrícola, tema que expone en este libro.

Libertad Juárez Santacruz; es Bióloga de formación con Maestría y Doctorado en Ciencias Ambientales, su trayectoria académica incluye la evaluación ecotoxicológica de matrices ambientales empleando a *Vicia faba* como bioindicador, con énfasis en el daño al DNA, su experiencia abarca los ensayos de aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas y micronúcleos, recientemente ha incluido a la batería de pruebas genotóxicas el ensayo cometa, tema que le ocupa en este texto.

Héctor Santos Luna Zendejas; es Biólogo de formación con Maestría en Ciencias (Biología) y Doctorado en Biotecnología Aplicada, su trabajo se centra en el área de Ecología de hongos micorrízicos, enfocándose en el impacto de insumos agrícolas (compostas, fertilizantes) sobre las poblaciones de hongos micorrízicos arbusculares, recientemente está involucrado en aprovechar los beneficios de los HMA para la remediación de áreas contaminadas, tema que describe en este libro.

Diciembre de 2013

Dr. Rogelio Costilla Salazar

Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato

AGRADECIMIENTOS

Un particular agradecimiento a nuestros estudiantes que con sus inquietudes nos impulsaron a exponer los temas que consideramos servirá de guía para el desarrollo de proyectos enfocados a evaluar la contaminación ambiental y esperamos que estimule su inclinación por esta área del conocimiento.

Este libro es el resultado del trabajo en equipo del Cuerpo académico “Ciencias Ambientales” UATLx-CA-39 y colaboradores, quienes expresan un amplio reconocimiento al apoyo recibido de las autoridades de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, a través de la Rectoría con el Programa Estratégico CACyPI-2013 (Cuerpos Académicos, Calidad y Productividad para su Internacionalización-2013).

Los autores

LA ECOTOXICOLOGÍA DESDE UNA PERSPECTIVA HOLÍSTICA EN LA
EVALUACIÓN INTEGRAL DE RIESGO

El término “Ecotoxicología” fue propuesto por Truhaut (1969) como una disciplina dentro del amplio campo de la Toxicología ambiental. Estudia el origen y comportamiento ambiental de los contaminantes, con un enfoque dirigido a evaluar los efectos adversos sobre plantas y animales, y las implicaciones sobre el ecosistema en un contexto integral. Estrictamente pareciera que la Ecotoxicología no considera al hombre, sin embargo, no pueden separarse; como un integrante del ecosistema y último eslabón del nivel trófico, el hombre recibe las consecuencias de una biota afectada por la contaminación. Por lo tanto en los estudios ecotoxicológicos la respuesta del ecosistema es evaluado en todos los niveles con un enfoque holístico (Figura 1).



Figura 1. Biocenosis y biotopo de un ecosistema

García-Nieto E. 2013. La Ecotoxicología desde una perspectiva holística en la evaluación integral de riesgo. En: *Evaluaciones ecotoxicológicas* (García-Nieto *et al.*). Universidad Autónoma de Tlaxcala, México. p. 15-23.

Los ecosistemas se han visto afectados por contaminación natural y antrópica que rebasa la capacidad de resiliencia de los mismos. Una gran diversidad de agentes químicos se libera de manera continua al ambiente [metales pesados, plaguicidas y Compuestos Organoclorados Persistentes (COPs), entre otros], los cuales se depositan y se van acumulando en matrices ambientales y en la biota. La magnitud de dicha bioacumulación no sólo afecta la estructura de invertebrados, sino que a su vez sugiere la transferencia trófica potencial de esos contaminantes, lo que representa un riesgo para todos los organismos que integran el ecosistema.

Algunos de estos agentes químicos quedan adsorbidos en el exterior de las plantas, otros tienen la capacidad de ingresar a través de las raíces o por el follaje, mediante mecanismos de difusión pasiva o co-transporte. Después del proceso de absorción pueden quedar retenidos solo en las raíces, o traslocarse a través del xilema y bioacumularse en otros órganos y tejidos (hojas, tallos y/o frutos).

La bioacumulación de agentes químicos en las plantas constituye una importante vía de exposición para la fauna, incluyendo al hombre, algunos contaminantes como los COPs se biomagnifican conforme incrementa el nivel trófico, y con ello se incrementa el riesgo de efectos tóxicos en las especies que se ubican en los niveles superiores de la cadena alimentaria (Noriega *et al.*, 2005). Para analizar el impacto de

los contaminantes sobre la población de una determinada especie es necesario entender como los agentes químicos afectan las etapas del ciclo vital (nacer, desarrollarse, reproducirse y morir), y cuáles son sus implicaciones.

La habilidad para establecer las relaciones de causa-efecto entre factores estresantes, derivados de actividades antrópicas y efectos ecológicos es particularmente importante en la política ambiental, ya que afecta aspectos tales como la regulación de los vertidos de aguas residuales, la preservación de espacios protegidos, las estrategias de remediación de ecosistemas y otros aspectos ambientales y legislativos. Las técnicas analíticas como la cromatografía, espec-

trofotometría y absorción atómica han facilitado la cuantificación de cantidades bajas de agentes químicos, producto de la contaminación ambiental, en la biota, sin embargo, establecer la significancia biológica de estos residuos químicos es más complicado. Las autoridades en materia del ambiente han implementado guías ambientales estrictas, no obstante, muchas sustancias pueden ocasionar efectos adversos a concentraciones por debajo de estas guías.

Por lo tanto, la detección de contaminantes en matrices ambientales no es suficiente a menos que los efectos sobre la biota sean apropiadamente evaluados. Además los contaminantes en el ambiente no se encuentran solos, generalmente existen mezclas complejas, cuyas interacciones (antagónicas o sinérgicas) puede llevar a la discrepancia entre la predicción del riesgo y el riesgo real que representa un compuesto único.

Los sistemas biológicos son el blanco de la acción de los tóxicos, por lo tanto proveen información importante que puede ser utilizada como herramienta en el diagnóstico del manejo ambiental integrado. Estudiar la distribución de especies de manera cualitativa y cuantitativa en un determinado ambiente es el principal parámetro ecotoxicológico, en el supuesto que la contaminación tendrá un efecto perjudicial sobre la estructura de la población. Sin embargo, este enfoque pone de relieve las limitaciones de la distribución de las especies como un indicador de éxito reproduc-

tivo y un sistema de alerta temprana para prevenir los efectos adversos de contaminantes en los niveles de población o comunidad.

Considerando el éxito reproductivo como el principal parámetro ecotoxicológico, es importante entender los factores físicos y biológicos que afectan el patrón normal de reproducción de especies naturales. Por lo tanto cualquier perturbación en el sistema somático podría conducir a la generación de respuestas biológicas que a su vez, permitiría utilizarse como un indicador del potencial deterioro de éxito reproductivo. Dadas las limitaciones inherentes al evaluar el éxito reproductivo en biota natural, es lógico evaluar otras respuestas compensatorias

subletales en el sistema somático y si es factible en los compartimientos germinales. Estudios de campo y de laboratorio han demostrado que efectos subletales y a nivel suborganismo (citotoxicidad, genotoxicidad, etc.) influyen en el metabolismo energético, acondicionamiento físico y reproductivo (Faßbender y Braunbeck, 2013; Rivero-Wendt, 2013).

Se ha sugerido que el aumento de la inestabilidad genómica desempeña papeles importantes en la disminución de las aptitudes de las poblaciones (Parsons, 1992; Clark, 1993). La necesidad de evaluar el impacto potencial de la inducción del daño genético ha creado un esencial y bien merecido espacio para la toxicología genética dentro del campo de la ecotoxicología, también llamada ecotoxicología genética o ecogenotoxicología para evaluar los efectos directos e indirectos de contaminantes sobre el DNA.

En ausencia de aplicaciones adecuadas de citogenética y ensayos moleculares en biota natural, el ensayo cometa ha revolucionado el campo de la ecogenotoxicología. Este ensayo ha proporcionado la oportunidad para el estudio de daños al DNA, reparación y muerte celular (apoptosis) en diferentes tipos celulares de la biota natural, sin conocimiento previo de la tasa de proliferación celular y de cariotipo (Dixon *et al.*, 2002). Después de la optimización adecuada del ensayo cometa (por ejemplo para obtener la suspensión de los núcleos o células), su aplicación se extiende a una gama de organismos filogenéticamente

heterogéneo que incluyen las plantas inferiores y superiores, oligoquetos, poliquetos, crustáceos, insectos, bivalvos, gasterópodos, peces, anfibios y mamíferos.

Quizá la contribución más grande de los ensayos de la genotoxicidad con plantas superiores, es el uso continuo para el monitoreo y evaluación *in situ* del aire, suelo y ambientes acuáticos, los cuales pueden realizarse a escala global. Los resultados con estos sistemas pueden ser una contribución significativa, ya que proporcionan datos que pueden ser utilizados como centinelas para proteger a la población de agentes que causen mutaciones. Sin duda alguna, los daños más importantes a nivel molecular son la inducción de varios

tipos de lesiones inducidas en el DNA, como roturas de hebra que eficientemente se miden mediante el ensayo cometa. Estas roturas si no son reparadas correctamente dan lugar a aberraciones cromosómicas, las cuales pueden conducir a la muerte celular, que podría llevar a varias condiciones patofisiológicas (Fadeel *et al.*, 1999). El daño al DNA de células germinales podría conducir a cambios permanentes heredables, mientras que en las células somáticas podría llevar a diversas enfermedades como la carcinogénesis.

Las plantas como *Avena sativa*, *Vicia faba*, *Raphanus sativus* y *Lactuca sativa*, entre otras, son sensibles a los contaminantes y pueden mostrar signos rápidos de crecimiento irregular, cambios bioquímicos, pérdida de biomasa o incluso llegar a la muerte (García-Gallegos *et al.*, 2011; 2012). Se ha demostrado que plantas que crecen en suelos con altos niveles de bifenilos policlorados (PCBs) presentan hojas deformadas de color marrón, así como inhibición del crecimiento, este último efecto relacionado con la inhibición de la proliferación celular (Gichner *et al.*, 2007). Las células mitóticas de las raíces de las plantas como *Vicia faba* (haba) y *Allium cepa* (cebolla) han mostrado ser genéticamente sensibles presentando aberraciones cromosómicas e incremento en la frecuencia de micronúcleos y rupturas de hebra simple del DNA cuando se exponen a diversos contaminantes (Dong y Zhang, 2010; Bu *et al.*, 2011; Juárez-Santacruz *et al.*, 2013).

El objetivo de los estudios ecotoxicológicos es por lo tanto determinar la aptitud, adecuación o eficacia biológica de las poblaciones (crecimiento, fertilidad y fecundidad), teniendo en mente que la sobrevivencia a largo plazo depende de la habilidad para reproducirse y crecer para mantener la estructura de la población en un particular nicho ecológico o ambiental.

Una manera de llevar a cabo estudios ecotoxicológicos en un escenario potencialmente peligroso es aplicando la metodología de evaluación integral de riesgo propuesta por la Organización Panamericana de la Salud. Esta metodología es una adecuación de los puntos clave de las metodologías de evaluación de riesgo a la

salud y riesgo ecológico, que tiene como objetivo determinar el peligro que representan los sitios potencialmente peligrosos y establecer los posibles mecanismos de restauración. La metodología propone cinco etapas fundamentales: 1) descripción del sitio, 2) análisis de la contaminación ambiental, 3) valoración de los componentes bióticos, 4) valoración de los componentes humanos y 5) caracterización del riesgo (Mejía *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2006).

La metodología de riesgo integral inicia con la descripción del sitio de estudio, con base en los antecedentes de contaminación si es que existen, posteriormente se obtienen datos de identidad del sitio que incluye entre otros, ubicación, población, actividades y características ecológicas. La información se verifica con la visita al sitio, donde además se obtiene información acerca de la preocupación de la comunidad con respecto a la situación ambiental, aunado a esto se identifican rutas de exposición, así como posibles fuentes de contaminación y tipos de contaminantes de la región.

La segunda etapa consiste en el análisis de la contaminación ambiental, donde se incluye un plan de muestreo que abarca la selección de la matriz ambiental (agua, suelo, sedimento, aire), considerando el tipo de compuesto que se sospecha estará presente en ese ambiente (metales, COPs, etc.), seguido de la selección de los sitios de muestreo en función de los puntos de exposición para la biota o población

humana, así como el número y tipo de muestra (superficial, profunda, compuesta).

Una vez que se ha determinado el tipo y la magnitud de los contaminantes presentes en el sitio, se debe investigar acerca de sus características toxicológicas y del comportamiento ambiental, para realizar una priorización de los contaminantes, con el fin de valorar los que realmente representen un riesgo.

Posteriormente, se genera un índice de toxicidad ambiental, de las matrices evaluadas y los sitios de muestreo que representen un mayor riesgo para la biota. Para la valoración de los componentes bióticos se obtiene un índice de integridad biótica que pro-

porcione un esquema de la salud del ecosistema en el sitio. Finalmente, se realiza un estudio con las especies nativas, donde además se evalúa la exposición de los organismos mediante diversos marcadores de exposición (cuantificando el compuesto dentro del organismo) y efectos (genotóxicos, neurológicos, de comportamiento, etc.).

Paralelamente se realiza la valoración de los seres humanos como integrantes de un ecosistema que puede estar en riesgo. Se selecciona el grupo de mayor exposición y el más susceptible (generalmente los niños). Al igual que para la biota se emplean biomarcadores de exposición y de efectos biológicos asociados a la toxicidad del compuesto, estos últimos se eligen con base en la toxicodinámica de los contaminantes críticos.

Finalmente, se realiza la caracterización del riesgo, donde cada sección debe ser discutida primero por separado y luego de manera integrada. En cada punto se discuten las limitantes, las incertidumbres y los factores confundentes. El análisis de la información se realiza con criterios rigurosos y consultando los antecedentes científicos reportados. Se comparan los datos del sitio contaminado contra los obtenidos en algún sitio de referencia (no contaminado) y contra valores de referencia disponibles en la literatura científica o que hayan sido reportados en alguna normatividad nacional o internacional. Habrán de exponerse análisis cualitativos y cuantitativos. Por último se de-

termina si existe riesgo, cuál es la magnitud de éste y cuáles serían las acciones que pudieran llevarse a cabo para disminuirlo.

Dentro de las acciones que se recomiendan para eliminar, reducir o controlar la exposición, existen una gama de posibilidades. Algunas de ellas de alto costo político y económico, como clausurar la fuente de contaminación en el caso de industrias, o desalojar y reubicar a la población de mayor exposición. Otras de costo intermedio, como técnicas de contención, confinamiento y descontaminación (Kaifer et al., 2004). Diversos investigadores estudian procesos de remediación biológica que aprovechan la capacidad depuradora de las plantas para la

remoción de los contaminantes a través de la degradación por diversos microorganismos de la rizósfera, cuyo principio básico consiste en destruir o modificar los materiales contaminantes con el fin de disminuir su peligrosidad. La biorremediación es una opción factible al utilizar plantas naturales o modificadas genéticamente, asociadas a microorganismos rizosféricos (Lasat, 2002; Bento *et al.*, 2012). Finalmente una opción que es la menos costosa pero de gran trabajo social y compromiso ético es la educación ambiental. Esta actividad se enfoca en dar a conocer a la población el riesgo que representa el tipo de contaminante y la matriz ambiental en donde se encuentra, y recomendar cambios en algunos hábitos alimenticios, actividades recreativas y de limpieza. Si bien la educación no soluciona el problema de fondo, si ayuda a disminuir la exposición.

Es importante tener en cuenta que enfrentar un problema de contaminación ambiental es compromiso de todos, la participación ciudadana, los académicos investigadores y particularmente la responsabilidad y obligación que tienen las autoridades competentes para tomar medidas que logren mitigar o disminuir el riesgo de la población afectada para que mejoren su calidad de vida.

LITERATURA CITADA

- Bento RA, Saggin-Júnior OJ, Pitard RM, Stralioetto R, Ribeiro da Silva EM, de Lucena Tavares RS, Teixeira Gerken de Landa FH, Martins LF, Garcia Torres Volpon A. 2012. Selection of leguminous trees associated with symbiont microorganisms for phytoremediation of petroleum contaminated soil. *Water Air Soil Pollut* 223:5659-5671.
- Bu N, Wang SH, Yu CM, Zhang Y, Ma CY, Li MX, Ma LJ. 2011. Genotoxicity of fenprothrin and fenitrothion on root tip cells of *Vicia faba*. *Bull Environ Contam Toxicol* 87:517-521.
- Clark GM. 1993. The genetic basis of developmental stability. I. Relationship between stability, heterozygosity and genomic coadaptation. *Genetica* 89:15-23.
- Dixon DR, Pruski AM, Dixon LRJ, Jha AN. 2002. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis* 17:495-507.
- Dong Y, Zhang J. 2010. Testing the genotoxicity of coking wastewater using *Vicia faba* and *Hordeum vulgare* bioassays. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:944-948.
- Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. 1999. Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun* 266:699-717.
- Faßbender C, Braunbeck T. 2013. Assessment of genotoxicity in gonads, liver and gills of zebrafish (*Danio rerio*) by use of the comet assay and micronucleus test after in vivo exposure to methyl methanesulfonate. *Bull Environ Contam Toxicol* 91(1):89-95.
- García-Gallegos E, García-Nieto E, Juárez-Santacruz L, Juárez-Santillán LF, Gómez-Camarillo AM. 2012. La respuesta de Haba (*Vicia faba*, L.) cultivada en un suelo contaminado con diferentes concentraciones de cadmio. *Rev Int Contam Ambient* 28(2):119-126.
- García-Gallegos E, Hernández-Acosta E, García-Nieto E, Acevedo-Sandoval OA. 2011. Contenido y traslocación de plomo en avena (*Avena sativa* L.) y haba (*Vicia faba* L.) de un suelo contaminado. *Rev Chapingo Ser Cienc For Am* 17(1):19-29.
- Gichner T, Lovecká P, Kochánková L, Macková M, Demnerová K. 2007. Monitoring toxicity, DNA damage, and somatic mutations in tobacco plants growing in soil heavily polluted with polychlorinated biphenyls. *Mutat Res* 629:1-6.
- Juárez-Santacruz L, García-Nieto E, Costilla-Salazar R, García-Gallegos E, Coronel-Olivares C, Gómez-Camarillo AM, Gaytán-Oyarzún JC. 2013. Assessment of the genotoxicity potential of sediments contaminated with POPs and agricultural soils using *Vicia faba* micronucleus assay. *Soil Sediment Contam* 22(6):288-300.
- Kaifer MJ, Aguilar A, Arana A, Balseiro C, Torá I, Caleyá JM, Pijls C. 2004. Guía de Tecnologías de Recuperación de Suelos Contaminados. Comunidad Madrid, Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Madrid 175 p.
- Lasat HA. 2002. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *J Environ Qual* 31(1):109-120.
- Mejía J, Yáñez L, Carrizales L, Díaz-Barriga F. 2002. Evaluación integral de riesgo en sitios contaminados (Una propuesta metodológica). 16 p. (En línea). <http://ambiental.uaslp.mx/docs/FDBEvalRiesgo.pdf> (nov 2013).
- Noriega OBR, Armienta AE, Chávez FMG, Cervantes ME, Ojeda FLE, Quevedo LIY. 2005. Valoración de genotoxicidad con determinación de micronúcleos en ratones expuestos a metamidofos. *Bol Médico* 1(8-9):13-17.
- Parsons PA. 1992. Fluctuating asymmetry: a biological monitor of environmental and genomic stress. *Heredity* 68:361-364.
- Rivero-Wendt CL, Miranda-Vilela AL, Ferreira MF, Borges AM, Grisolia CK. 2013. Cytogenetic toxicity and gonadal effects of 17 α -methyltestosterone in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) and *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). *Genet Mol Res* 12(3):3862-70.
- Torres A, Espinosa-Reyes G, Ilizaliturri C, González DJ, Razo I, Mejía J, Díaz-Barriga F. 2006. Diseño y aplicación de una metodología para la evaluación integrada de riesgos ambientales en sitios peligrosos de México. http://www.ine.gob.mx/descargas/sqre/2005_inf_fnal_met_integrada.pdf (Mayo 2012).
- Truhaut R. 1977. Eco-Toxicology - Objectives Principles and Perspectives. *Ecotoxicol Environ Saf* 1(2): 151-173.

MUESTREO EN SITIOS CONTAMINADOS, PROCESAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

INTRODUCCIÓN

El suelo, como parte de la litósfera, es un componente esencial del ecosistema terrestre, debido a que el crecimiento de las plantas y los ciclos biogeoquímicos dependen de él, es un material no consolidado de profundidad variable. Está constituido por las fases sólida, líquida y gaseosa en continua interacción. Se caracteriza por tener diferentes horizontes, resultado de las adiciones, pérdidas, transferencias y transformaciones de energía y materia a través del tiempo (Volke *et al.*, 2005). Su composición química varía en forma horizontal y vertical y está determinada por el tipo de material geológico, cubierta vegetal, meteorización, topografía y actividad biológica, además de las actividades antrópicas. El sedimento es una capa de partículas minerales y orgánicas que se encuentran en el fondo de reservorios de aguas naturales (lagos, ríos) (Figura 1).



Figura 1. Suelo y sedimento matrices esenciales para la vida

García-Gallegos E. 2013. Muestreo en sitios contaminados, procesamiento y conservación de las muestras. En: *Evaluaciones ecotoxicológicas* (García-Nieto *et al.*) Universidad Autónoma de Tlaxcala, México. p. 25-36.

La composición de minerales con respecto a la materia orgánica varía dependiendo del lugar, generalmente poseen un elevado contenido de materia inorgánica (70 %) en forma de óxidos, carbonatos, sulfuros y sulfatos (Hernández, 2007; Masís *et al.*, 2008).

Los suelos y sedimentos como parte de los ecosistemas proporcionan los nutrientes esenciales, agua, soporte y un depósito, tanto para los detritos orgánicos (residuos de la descomposición de fuentes orgánicas), como para las aportaciones naturales o la deposición atmosférica de contaminantes. Al compararse con el aire y el agua, los suelos y sedimentos son un medio más variable y complejo en su composición. Se consideran sistemas depuradores, ya que son capaces de degradar o inmovilizar los contaminantes, funcionan como un filtro, que retarda el paso de los compuestos químicos a las aguas subterráneas o como un bioreactor en el que muchos compuestos orgánicos pueden degradarse (Centro Nacional del Medio Ambiente, 2010). En el suelo, la erosión y la continua urbanización causan un impacto negativo en su comportamiento, provocando la pérdida parcial o total de su productividad. La acumulación de contaminantes en suelo y sedimento puede ser un riesgo potencial para los integrantes del ecosistema. En el sedimento los contaminantes no quedan permanentemente retenidos, pueden transportarse a otras matrices ambientales (agua, suelo o aire) por cambios en las condiciones ambientales, tales como temperatura, pH, oxígeno disuelto, coloides orgánicos

y ya sea que estén suspendidos en la columna de agua o depositados en el sedimento, la biota acuática estará expuesta a ellos y dependiendo del contaminante se bioacumulará e ingresará en la cadena trófica (Montalvo *et al.*, 2003). La base para evaluar suelo y sedimento en sitios potencialmente contaminados, está en un muestreo adecuado.

Esto permitirá que los resultados del análisis ambiental (cuantificación de contaminantes) y biológico (biomarcadores de exposición y efecto), tengan una interpretación confiable que refleje la magnitud de la contaminación y sea un soporte para la caracterización del riesgo en el sitio de estudio (Etchevers y Padilla, 2007; Hernández, 2007).

La caracterización de un sitio, implica actividades de muestreo y análisis ambiental que tienen como finalidad determinar la extensión y naturaleza de la contaminación, lo cual provee las bases para adquirir la información técnica necesaria para desarrollar, proyectar, analizar y seleccionar las técnicas de remediación.

El objetivo principal de cualquier operación de muestreo es recolectar suelo/sedimento representativo de un sitio, esto es, que una muestra o grupo de ellas refleje con precisión la concentración y estado de cualquier componente en un determinado lugar y tiempo. El muestreo de suelo se diseña y conduce para cumplir con uno o varios de los siguientes objetivos: a) determinar el riesgo a la salud humana y/o al ambiente, debido a la contaminación del sitio por contaminantes específicos, b) determinar la presencia y concentración de contaminantes, con respecto a niveles de fondo (concentraciones naturales en el sitio), c) determinar la concentración de contaminantes y su distribución espacial y temporal, d) determinar el riesgo potencial a la flora y fauna (lombrices, bacterias y hongos) por contaminantes presentes en el sitio a través de bioensayos ecotoxicológicos, e) identificar fuentes de contaminación, mecanismos o rutas de transporte y receptores potenciales, f) medir la eficiencia de acciones de control o de limpieza (remediación) y g) obtener mediciones para validación o uso de modelos de transporte y deposición de contaminantes en el suelo (Volke *et al.*, 2005).

Las muestras de suelo/sedimento deben ser representativas del sitio; sin embargo, existen variables que pueden afectar su representatividad: a) variaciones en la composición mineralógica del suelo y propiedades físicas, químicas y biológicas, b) variaciones en la composición química de los contaminantes en el sitio, c) variaciones temporales en la composición del medio, d) errores sistemáticos o esporádicos que se producen en el propio muestreo, en la manipulación y en el transporte de las muestras al laboratorio, e) errores en los resultados analíticos por un incorrecto almacenamiento o por la preparación de la muestra en el laboratorio (Hernández, 2007). Cada sitio contaminado requiere de un particular

muestreo, Volke *et al.* (2005) mencionan que se puede llevar a cabo un muestreo exploratorio, el cual está diseñado para obtener información preliminar respecto al sitio, por otro lado, se puede realizar un monitoreo con el fin de adquirir información acerca de la variación de las concentraciones de parámetros específicos durante un lapso determinado o dentro de un área geográfica específica. Además de seleccionar el tipo de muestreo, es importante establecer la profundidad (superficial o vertical), tipo de muestra (simple o compuesta) y cantidad de muestra a recolectar.

Las muestras simples representan las condiciones puntuales del suelo/sedimento contaminado en el tiempo que fue recolectado y se pueden considerar representativas cuando la composición de los contaminantes es estable; mientras que, las compuestas minimizan las variaciones, su preparación puede disminuir costo y tiempo en los análisis (Rodríguez y Rodríguez, 2002).

Existen dos profundidades importantes para un muestreo ambiental: a) superficial (0-15 cm), que refleja la deposición de contaminantes transportados por aire o depositados recientemente; y b) sub-superficial (> 15 cm), en donde pueden encontrarse contaminantes depositados por lixiviación y derrames de líquidos o por entierros que pueden encontrarse a profundidades considerables (Csuros y Csuros, 2002). Es importante considerar que las características físicas, químicas y biológicas del sitio inciden en

la transformación, retención y movimiento de los contaminantes a través del suelo o sedimento. El contenido de arcilla, materia orgánica, pH, potencial redox, capacidad de intercambio catiónico, conductividad eléctrica y el contenido de microorganismos, afectan la velocidad de migración y la forma química del contaminante (Mason, 1992).

Además de la información sobre el comportamiento ambiental de los contaminantes, la caracterización del suelo o sedimento ayuda a definir las estrategias de remediación (Hernández *et al.*, 2006).

El suelo es un ecosistema que contiene una gran diversidad de microorganismos (bacterias, hongos, etc), las

características químicas, físicas y biológicas, así como la presencia de plantas y contaminantes influyen en el número y actividad microbiana, características que deben considerarse durante el muestreo de suelo rizosférico y del sistema radicular (Figura 2). Los microorganismos presentes en el suelo mantienen un equilibrio estable. Cuando se introducen plantas al suelo, las raíces liberan sustancias (proteínas, aminoácidos, hormonas, entre otras) que aprovechan los microorganismos, como los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), quienes forman una asociación simbiótica con las raíces, lo cual les permite reconocer el estado nutricional de las plantas, y los posibles efectos ocasionados por la presencia de contaminantes en el suelo. Por lo tanto, los HMA se consideran excelentes indicadores de contaminación ambiental (González y Rodríguez, 2005). Los indicadores biológicos de la calidad del suelo, en especial los relacionados con la biomasa, actividad y biodiversidad de

las comunidades microbianas, tienen un enorme potencial para evaluar el efecto de suelos contaminados (Garbisu *et al.*, 2007). Para esto, las muestras de suelo rizosférico se deben tomar húmedas para facilitar su extracción y como los microorganismos se desarrollan en los primeros centímetros de la superficie, se recomienda recolectarlo de 0 a 20 cm, aunque puede variar en función del interés del investigador (Sagarido y Mandolesi, 2004).



Figura 2. Sistema radicular y suelo rizosférico

OBJETIVO

Explicar el muestreo de suelo, sedimento, suelo rizosférico y sistema radicular de sitios contaminados, así como el procesamiento y almacenaje en el laboratorio hasta el análisis físico, químico y biológico.

MATERIAL

Balanza granataria

Bolsas de plástico de 0.5, 1 y 2 kg

Etiquetas

Guantes de plástico

Hielera

Marcador indeleble

Mortero y pistilo

Pala recta

Pala de acero inoxidable

Pala de plástico

Papel aluminio

Papel de estraza

Recipientes de aluminio

Recipientes de plástico de 1 L

Recipientes de vidrio color ámbar de 1 L

Tamiz malla 600 μm

Tamiz malla 2 mm

Tina de plástico

EQUIPO

Estufa de secado

Refrigerador

GPS

REACTIVOS

Etanol al 70 %

Agua destilada

METODOLOGÍA

Muestreo de suelo y sedimento

Muestra simple

Son las muestras recolectadas en un tiempo y en un lugar particular y representan las condiciones puntuales de una muestra de la población en el tiempo que fue recolectada. Se elige un área libre de hierba y material de construcción que pudiera interferir con la contaminación propia del sitio. Recoger aproximadamente 1 kg de suelo o sedimento superficial (0-15 cm) utilizando pala de acero inoxidable para contaminantes orgánicos y pala de plástico para metales pesados. Para analizar compuestos orgánicos las muestras de suelo se envuelven con papel aluminio y se transportan en bolsas de plástico, y los sedimen-

tos se depositan en recipientes de vidrio de color ámbar.

Para el análisis de metales y la caracterización fisicoquímica las muestras se transportan en bolsas o recipientes de plástico (Figura 3). El muestreo se puede realizar a diferentes profundidades de acuerdo al interés y protocolo del investigador.

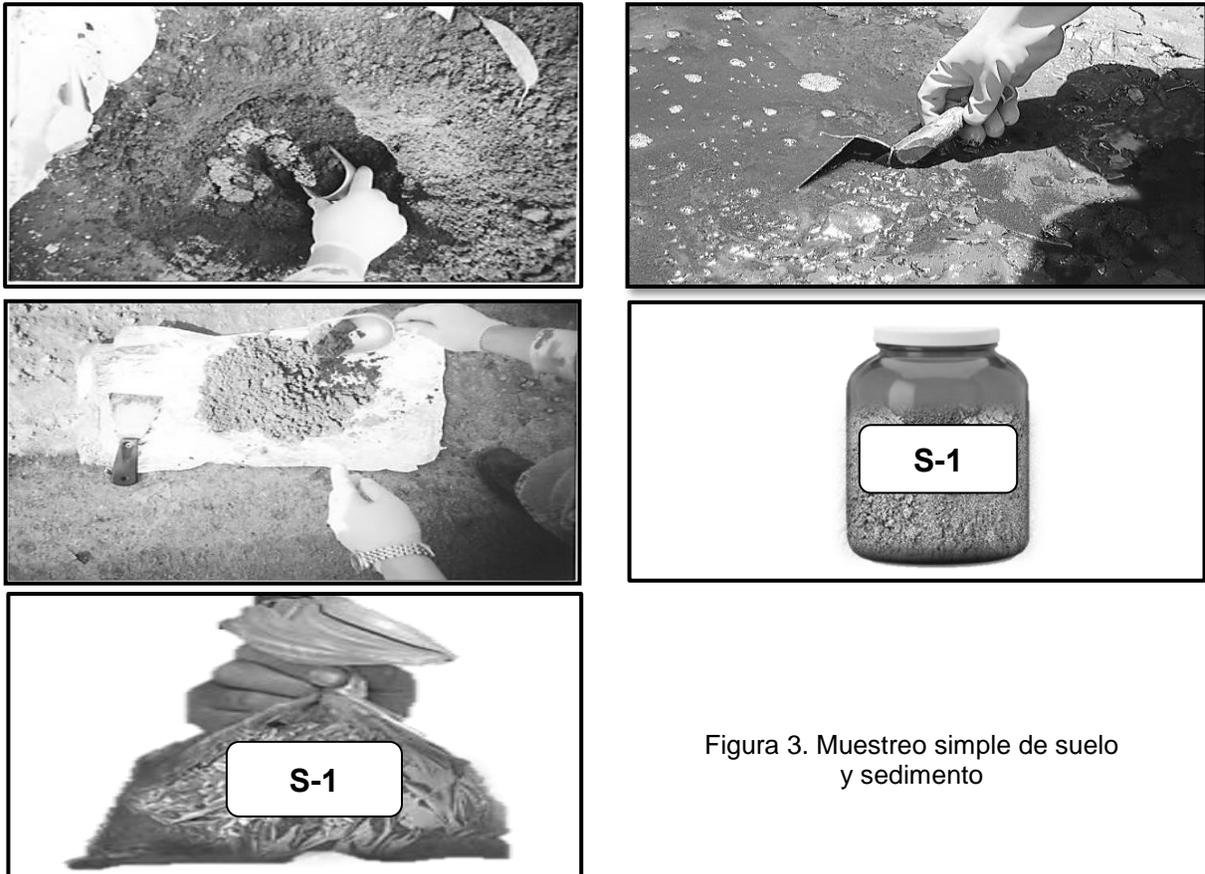


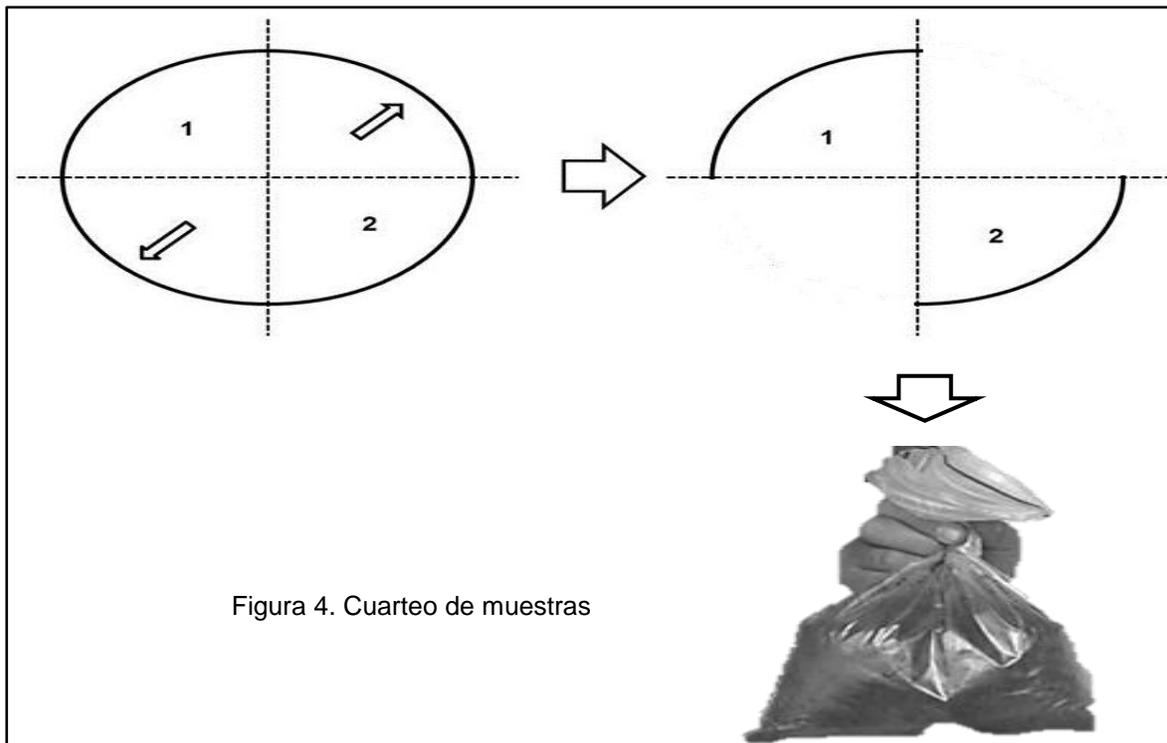
Figura 3. Muestreo simple de suelo y sedimento

Muestra compuesta

Es la mezcla de muestras individuales o submuestras que representa el promedio de la composición del área de estudio. Se recolectan varias muestras simples siguiendo un patrón de muestreo (zig-zag) que contengan la misma cantidad de suelo o sedimento y que representen el mismo horizonte. Se mezclan las submuestras para obtener una muestra compuesta y homogénea. Para evitar la contaminación con otros materiales, el mezclado se debe realizar en recipientes y con pala de acero inoxidable para los compuestos orgánicos o de plástico para metales pesados. Para realizar el cuarteo se divide el suelo o sedimento en cuatro partes iguales, de las cuales se desechan dos cuartos opuestos y con los dos restantes se repite el proceso de mezclado para obtener una muestra compuesta de 1 kg (Figura 4).

El transporte de las muestras se realiza en recipientes de plástico para la cuantificación de metales y la caracterización fisicoquímica y en recipientes de vidrio color ámbar para la cuantificación de compuestos orgánicos.

Todas las muestras se transportan en hieleras cuidando de mantener la cadena de frío para la conservación de los compuestos.



Muestreo de sistema radicular y suelo rizosférico

Se elige el área de estudio y se divide en cuadrantes (5 x 6 m) se recolectan entre 5 a 10 muestras simples por cuadrante. El suelo rizosférico se recolecta perforando con una pala de acero inoxidable (compuestos orgánicos) o de plástico (metales pesados) a una profundidad de entre 15 y 20 cm, abarcando una periferia de 15 cm circundante al tallo de la planta. Se colecta entre 1 y 2 kg de suelo rizosférico junto con el sistema radicular. Se separa la radícula del suelo de cada submuestra y se mezclan para obtener una muestra compuesta de suelo rizosférico que represente la población de esporas de HMA del sitio contaminado (Figura 5). El suelo rizosférico se divide en dos partes una para el análisis microbiológico de HMA que se deposita en bolsas de plástico y se transporta en frío. La otra parte se almacena en reci-

ipientes de plástico para el análisis fisicoquímico y cuantificación de metales, o en vidrio color ámbar (papel aluminio dentro de bolsas de plástico) para la determinación de compuestos orgánicos. El sistema radicular se lava con agua de grifo para eliminar el resto de suelo rizosférico y se transporta en frascos que contengan etanol al 70 % para la conservación de los HMA.

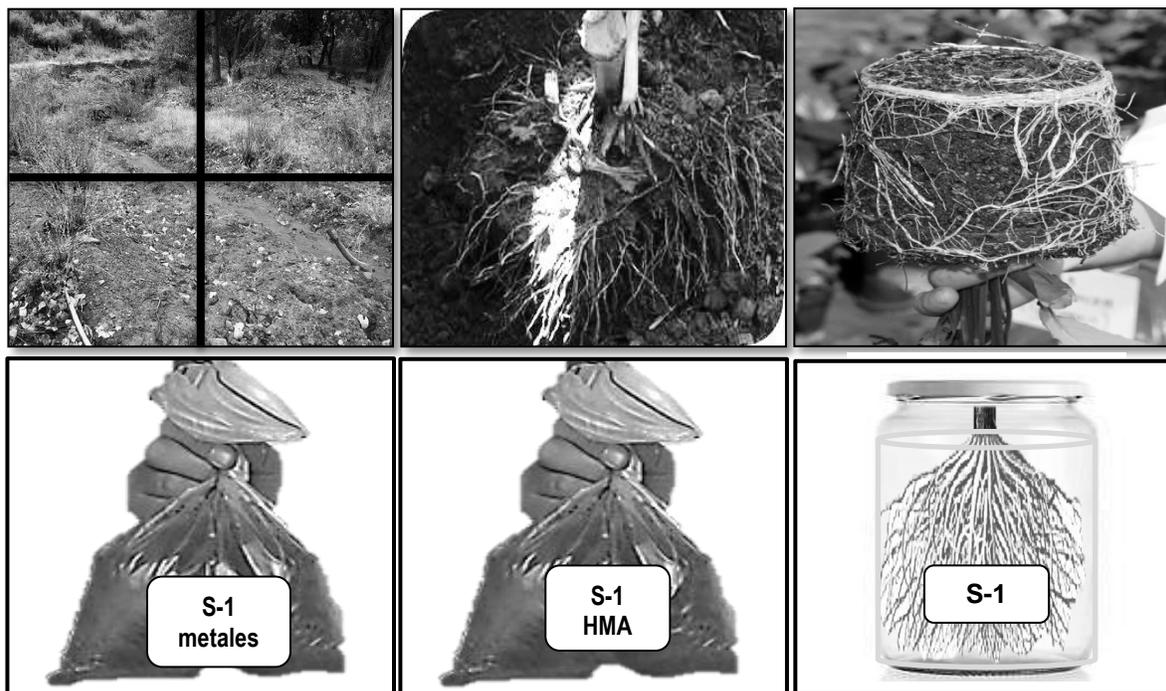


Figura 5. Muestreo del sistema radicular y suelo rizosférico

Procesamiento de suelo, sedimento y suelo rizosférico

Vaciar las muestras en recipientes de aluminio para el análisis de compuestos orgánicos, en morteros de cerámica para el análisis de metales y en papel estrasa para la caracterización fisicoquímica. Los recipientes de aluminio y morteros se colocan en la estufa a 70 °C. Las muestras que van en papel estrasa, se depositan en un área del laboratorio a la sombra, a temperatura ambiente hasta su secado (Figura 6).

Destruir con el pistilo los terrones que se hayan formado durante el secado y eliminar hierba, viruta, basura o cualquier material que pudiera interferir con la constitución propia del suelo, antes de realizar el tamizado.

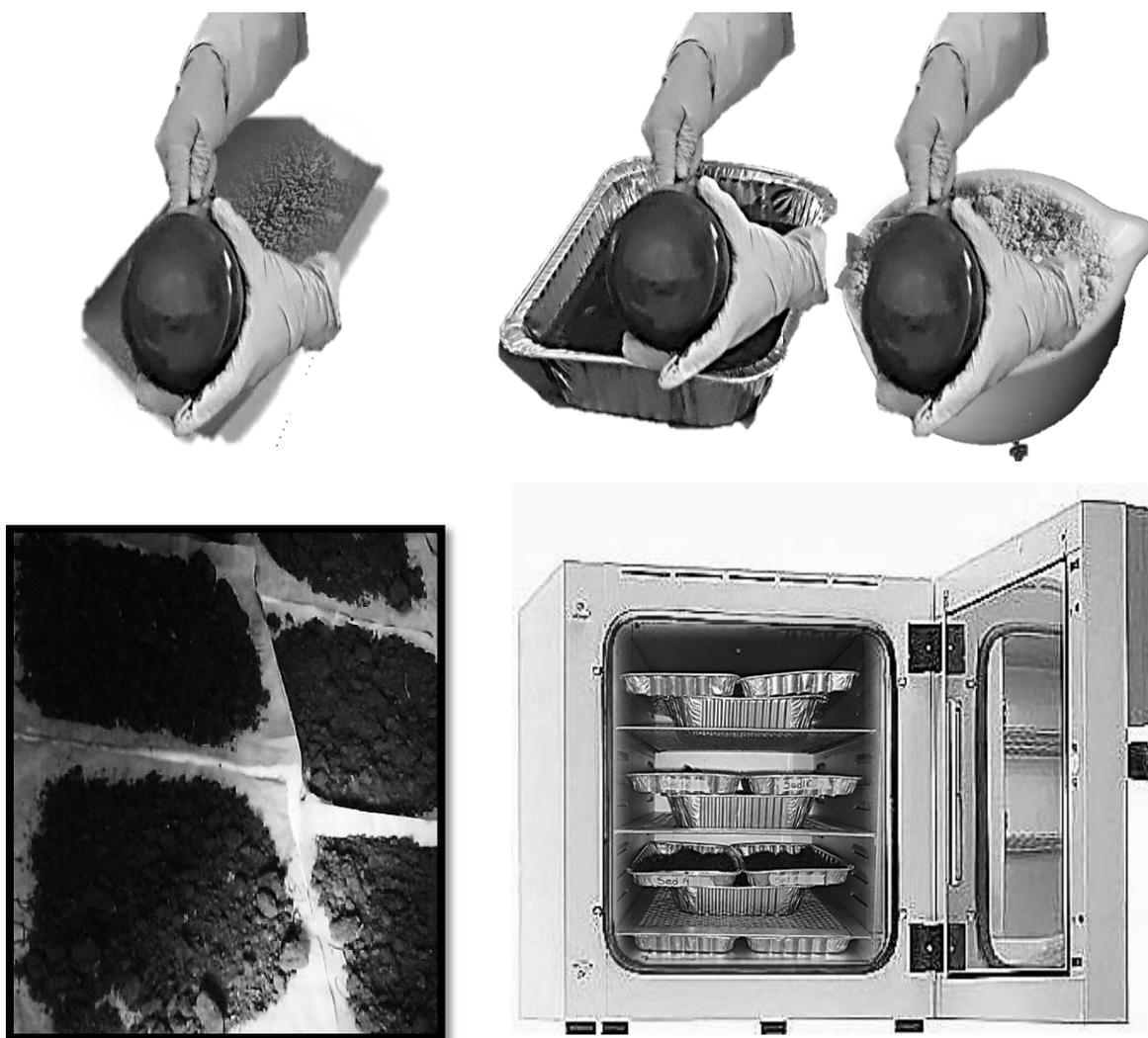


Figura 6. Secado de suelo, sedimento o suelo rizosférico

Tamizar por malla de 600 μm (tamiz No. 30) de apertura de malla para la cuantificación de metales y compuestos orgánicos y por malla de 2 mm (tamiz No. 10) para el análisis de fisicoquímicos. Almacenar en frasco de vidrio color ámbar para la determinación de compuestos orgánicos y en recipientes de plástico para metales y conservar a 4 °C. Para la caracterización fisicoquímica de suelo, sedimento y suelo rizosférico, almacenar en recipientes de plástico a temperatura ambiente (Figura 7).

Análisis fisicoquímico de las muestras

De cada muestra se toma una cantidad de 250 g para realizar las determinaciones de los parámetros físicos y químicos que intervienen en la movilidad y biodisponibilidad de los contaminantes presentes; se determina textura, por el hidrómetro de Bouyoucos (Rodríguez y Rodríguez, 2002); pH, en una suspensión de suelo:agua (1:2 p/v) (Jackson, 1976); conductividad eléctrica (CE), en el extracto de saturación (Richards, 1990); contenido de materia orgánica, por el método de Walkley-Black (Jackson, 1976), la capacidad de intercambio catiónico (CIC), por la técnica con acetato de amonio (Chapman, 1965).

Se mide el porcentaje de humedad de 100 g de suelo rizosférico por secado en estufa (105 °C) hasta peso constante. El peso final se empleará para corregir el número de esporas contabilizadas en 100 g de suelo rizosférico húmedo (Capítulo 6).



Figura 7. Tamizado y almacenamiento de suelo sedimento y suelo rizosférico

LITERATURA CITADA

- Aguirre MG, Rudolph A, Ahumada R, Loyola R y Medina V. 2009. Toxicidad no específica en sedimentos portuarios, una aproximación al contenido de contaminantes críticos. *Revista Biol. Marina y Oceanografía* 44: 725-735.
- Centro Nacional del Medio Ambiente. 2010. Análisis de la composición físicoquímica de los sedimentos fluviales y su relación con la disponibilidad de metales en agua (introducción-metodología). SIT No. 207. Tomo II de V. Gobierno de Chile, Ministerio de Obras Públicas, Dirección General de Aguas, Departamento de Conservación y Protección de Recursos Hídricos, Santiago, Chile. 69 p.
- Chapman HD. 1965. Cation Exchange capacity. *In*: Black CA. (ed.). *Methods of analysis. Part 2. Agronomy* 9. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin.
- Csuros M y Csuros C. 2002. *Environmental sampling and analysis for metals*. Lewis Publisher. 372 p.
- Etchevers BJD y Padilla CJ. 2007. Diagnóstico de la fertilidad del suelo. En: Alcántar GG y Trejo TLI. (Coords). 2007. *Nutrición de cultivos*. Colegio de Postgraduados. Montecillo y Mundi Prensa, México. D.F.
- Garbisu C, Becerril JM, Epelde L y Alkorta I. 2007. Bioindicadores de la calidad del suelo: herramienta metodológica para la evaluación de la eficiencia de un proceso fitorremediador. *Revista Ecosistemas* 16:44-49.
- González ChMC y Rodríguez EMA. 2005. La micorriza arbuscular en suelos contaminados con residuos de minas. En: González ChMC, Pérez MJ y Carrillo GR. (eds.). 2005. *El sistema planta-microorganismo-suelo en áreas contaminadas con residuos de minas*. Colegio de Postgraduados. Montecillo, estado de México. 161 p.
- Hernández AE, Gutiérrez CC, Rubiños PJE y Alvarado LJ. 2006. Caracterización del suelo y plantas de un sitio contaminado con hidrocarburos. *TERRA Latinoamericana* 24:463-470.
- Hernández JL. 2007. *Métodos para el análisis físico de suelos. Manual de laboratorio*. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Ediciones INCA La Habana, Cuba. 54 p.
- Jackson ML. 1976. *Análisis químico de suelos*. Trad. al español por Beltrán MJ. 3ª. Ed. Omega. Barcelona, España. 622 p.
- Masís F, Váldez J, Coto T y León S. 2008. Residuos de agroquímicos en sedimentos de ríos, Poás, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 32:113-123.
- Mason B. 1992. Preparation of soil sampling protocols: sampling techniques and strategies. USEPA, EPA/600/R-92/128. 169 p.
- Montalvo JF, García I y Perigó E. 2003. Composición química de los sedimentos asociados a los arrecifes coralinos del Archipiélago Sabana Camagüey. *Contribución a la Educación y la Protección Ambiental*. 4:321-330.
- Sagardoy MA, Mandolesi ME. 2004. *Biología del suelo. Guía de estudio*. Universidad Nacional del Sur. Departamento de Agronomía. Argentina. 95 p.
- Richards LA. 1990. Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos. 6ª ed. Departamento de Agricultura de Estados Unidos de América. Editorial Limusa, México, D.F.
- Rodríguez FH y Rodríguez AJ. 2002. *Métodos de análisis de suelos y plantas, criterios de interpretación*. Editorial Trillas, México, D.F. 196 p.
- Volke ST, Velasco TJA y De la Rosa PDA. 2005. *Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. México, D.F. 141 p.

**TAMIZAJE EN SITIOS POTENCIALMENTE CONTAMINADOS:
DIOXINAS EN SUELO Y SEDIMENTO POR ELISA****INTRODUCCIÓN**

Las dioxinas o policlorodibenzodioxinas (PCDD), constituyen una familia de 75 hidrocarburos clorados que son estructuralmente similares, la 2,3,7,8-tetraclorodibenzodioxina (2378 TCDD) y el 1,2,3,7,8-pentaclorodibenzodioxina (12378 PeCDD), son considerados los congéneres más tóxicos (Figura 1). La generación de PCDD requiere: 1) temperatura de 300 a 400 °C, 2) fuente de carbono que podría ser madera, hidrocarburos y compuestos orgánicos, 3) fuente de cloro, como plaguicidas organoclorados (pentaclorofenol, DDT, 2,4 D) o cloruro de sodio presente en los basureros municipales, 4) oxígeno, cuya función es la oxidación del carbono facilitando la formación de estructuras cíclicas y la cloración de las mismas, 5) catalizador como el Cu, Fe, Pb o Zn. Las PCDD se generan de manera natural durante las erupciones volcánicas e incendios forestales, y en diversas actividades antrópicas como subproductos de procesos industriales que involucran la manufactura de compuestos orgánicos clorados, el uso de cloro durante el blanqueado del papel y la pirólisis a altas temperaturas (ATSDR, 1998).

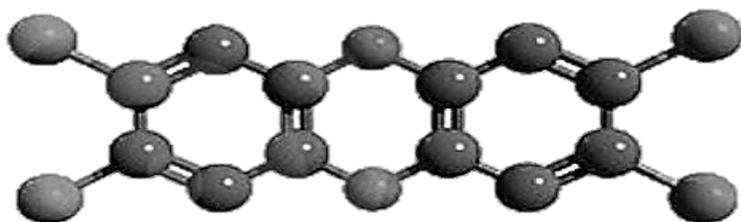


Figura 1. 2378 TCDD, molécula representativa de las PCDD

García-Nieto E. 2013. Tamizaje en sitios potencialmente contaminados: dioxinas en suelo y sedimento por ELISA. En: *Evaluaciones ecotoxicológicas* (García-Nieto et al.) Universidad Autónoma de Tlaxcala, México. p. 37-66.

En el 2007, México elaboró el Plan Nacional de Implementación (PNI) del Convenio de Estocolmo, que incluye un inventario nacional de liberaciones de dioxinas y furanos para México. La metodología utilizada para la elaboración del inventario 2004 se basó en el uso del instrumental normalizado de PNUMA (Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente). Se elaboran 3 versiones de este inventario: a) edición 2007, b) revisión 2010 y c) revisión 2012. Esta última considera 75 fuentes estimadas (47 que no habían sido estimadas en las versiones anteriores) y la revisión de los datos de actividad de algunas fuentes previamente estimadas. El inventario 2012 reportó una emisión total de 9,722 g TEQ/año y coloca a la industria química, la quema no controlada de desechos domésticos, los incendios en vertederos y la quema de biomasa, como las cuatro fuentes prioritarias (Maíz y Morales, 2012). Las dioxinas pueden cruzar las membranas celulares y unirse al receptor citosólico de hidrocarburos aromáticos (Ahr), el com-

plejo formado por la dioxina y el Ahr se disocia de las proteínas chaperonas (hsp90, p23 y XAP2) y se trasloca al núcleo, ahí se dimeriza con la proteína traslocadora nuclear del receptor de hidrocarburos aromáticos (Arnt), lo cual resulta en la conversión de un complejo heteromérico con alta afinidad al DNA, que actúa como un factor de transcripción que altera el patrón de expresión de ciertos genes (Kazlauskas *et al.*, 2000) (Figura 2).

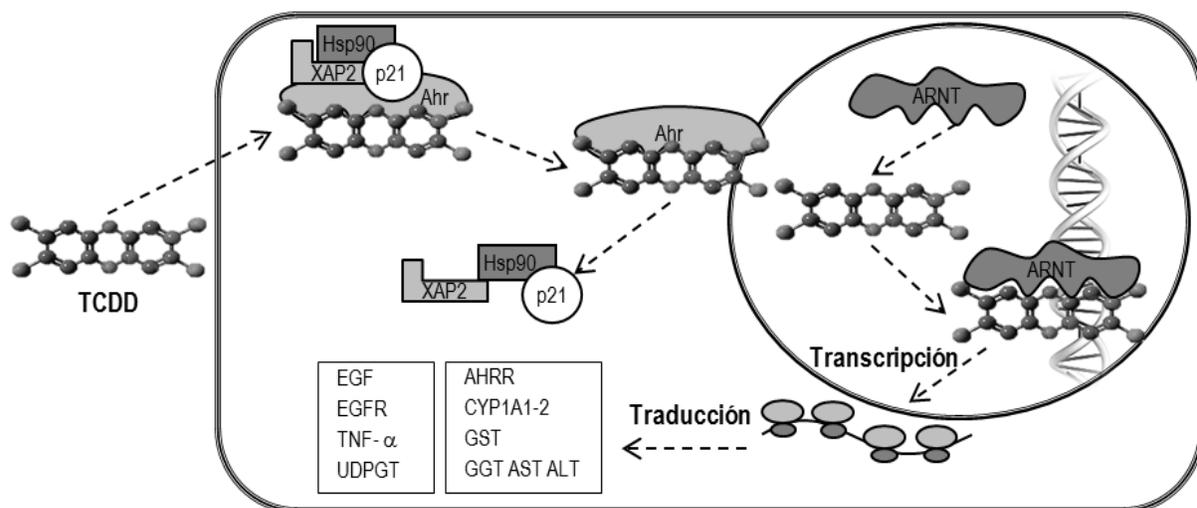


Figura 2. Mecanismo de toxicidad de las dioxinas

Los efectos bioquímicos de las dioxinas pueden ser divididos en tres clases: 1) alteraciones metabólicas debido a los cambios enzimáticos, 2) alteraciones en la homeostasis alterando el funcionamiento hormonal y sus receptores, y 3) alteraciones en el crecimiento y diferenciación como un resultado de cambios en factores de crecimiento y sus receptores (Birnbaum *et al.*, 1994; ATSDR, 1998)

Como se mencionó anteriormente las dioxinas están constituidas por 75 congéneres cuya toxicidad varía según el número y la posición de átomos de cloro en la molécula. Las muestras ambientales y biológicas son una mezcla de congéneres, y dependiendo de la fuente emisora predominarán unos sobre otros. Diversas organizaciones internacionales diseñaron una clasificación para identificar la capacidad tóxica de cada congénere a la que denominaron Factores de Equivalencia Tóxica (TEF). Dichos valores son equivalentes debido a que se comparan con la toxicidad de la 2378-TCDD que fue considerada con el valor de la unidad. La 12378-PeCDD presenta también un TEF de 1, mientras que el resto de los congéneres tienen una toxicidad equivalente menor a la unidad. Cabe mencionar que algunos congéneres de la familia de los policlorodibenzofuranos (PCDF) y policlorobifenilos (PCB) poseen una toxicidad similar a las dioxinas por lo que se les conoce como “like dioxinas” y se les asigna un valor de TEF (Anexo 1). Para evaluar la toxicidad total de una muestra se cuantifica cada congénere por cromatografía de gases de alta

resolución con espectrometría de masas de alta resolución (HRGC /HRMS) y se multiplica por su TEF para obtener los Equivalentes Tóxicos (TEQ) (Anexo 2). Es evidente entonces, que en un sitio contaminado, habría que monitorear sobre todo a los congéneres más tóxicos (2378 TCDD y 12378 PeCDD).

Las dioxinas son extremadamente persistentes en el ambiente, tienen una alta resistencia a la degradación física, química y biológica, con una vida media que va de 10 a 30 años en suelo superficial y hasta de 100 años en el subsuelo y sedimentos, son semi-volátiles por lo que pueden viajar grandes distancias. Las PCDD son liposolubles lo que les permite bioacumularse en tejidos grasos y bio-

magnificarse en la cadena trófica. Estas características aunadas a su elevada toxicidad han llevado a los organismos gubernamentales a implementar normas estrictas para la protección de la salud humana. El PNUMA propone como guía ambiental un nivel de 100 ppt TEQ en suelo de áreas de recreación infantil (Friedler, 1999), por su parte la Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR), considera tres niveles de acción que aplican para la exposición humana por ingesta de suelo contaminado con dioxinas y compuestos like-dioxinas en áreas residenciales: 1) Detección de contaminantes (< 50 ppt TEQ), si uno o más suelos exceden este valor se requieren estudios más específicos; 2) Evaluación de posibles vías de exposición (50-1000 ppt TEQ), si la concentración de dioxinas en suelo se encuentra entre este intervalo, se recomienda evaluar la extensión de la exposición y las implicaciones en salud; y 3) Nivel de acción (> 1000 ppt TEQ), si el suelo supera este valor se deben considerar estrategias para prevenir la exposición (De Rosa *et al.*, 1997). Como se puede apreciar, el nivel de acción de estas guías se encuentra en el orden de partes por trillón (ppt o pg/g). La metodología y el equipo para lograr detectar y cuantificar a las PCDD requiere una elevada sensibilidad, se emplea la HRGC/HRMS que es capaz de cuantificar a niveles incluso de partes por cuatrillón (ppq o fg/g), sin embargo, este método es sumamente costoso, \$1,141.81 USD por una muestra (Ustarrán-Cervantes, 2007). Este hecho es la principal causa de escasez de reportes que indiquen los niveles

de dioxinas en matrices ambientales o biológicas en México. En uno de los pocos estudios se reportan niveles de 0.5 pg/g TEQ de PCDD en tres muestras de mantquilla producidas en el estado de Guanajuato y Jalisco (Santillo *et al.*, 2003), el otro estudio presenta niveles de dioxinas en huevos de granjas familiares recolectados cerca del complejo petroquímico localizado en Coatzacoalcos Veracruz, con concentraciones 10 veces arriba de la norma de 2 pg/g TEQ (DiGangi *et al.*, 2005).

En el IV Taller sobre fuentes y medición de dioxinas, furanos y hexaclorobenceno, realizado en el marco del programa de Manejo Adecuado de Químicos (MASQ) de la Comisión

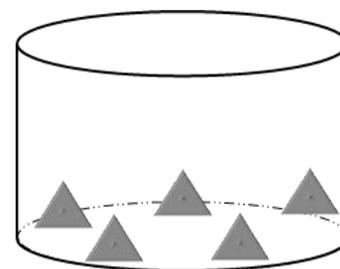
de Cooperación Ambiental de América del Norte (CCA), se informa que en México existe un equipo de HRGC/HRMS en el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA-SAGARPA) donde actualmente están implementando la metodología para la cuantificación de dioxinas, sin embargo, aun cuando se tenga el método validado y el costo del análisis por muestra se vea reducido, éste seguirá siendo muy elevado.

Una alternativa a la cromatografía son los inmunoensayos y precisamente uno de ellos es el inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) para la cuantificación de PCDD. Esta metodología fue desarrollada por investigadores de la Universidad de Davis, California, quienes sintetizaron un anticuerpo policlonal (R7598), un antígeno (0626-BSA) y un subrogado (TMDD) (Sugawara *et al.*, 1998; 2002; Nichkova *et al.*, 2004). El TMDD cruza al 100 % con el anticuerpo policlonal pero es menos tóxico que la 2378-TCDD. El uso del ELISA es de gran utilidad para fines de rastreo o exploración ya que el costo por muestra para determinar dioxinas en suelo o sedimento, es relativamente bajo (\$ 400.00 pesos), por lo que se pueden analizar una gran cantidad de muestras en poco tiempo y a bajo costo. El anticuerpo policlona (Ac), el subrogado y el antígeno (Ag) no son comerciales, el Dr. Hammock jefe del departamento de Entomología de UC Davis, donó estos reactivos para fines de investigación. Este método es de tipo competitivo. La terminación carboxílica del Ag 0626-BSA se adhiere a las

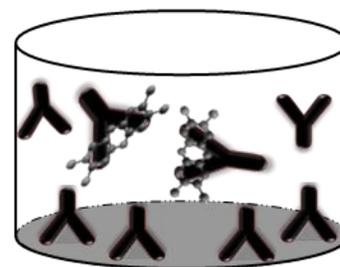
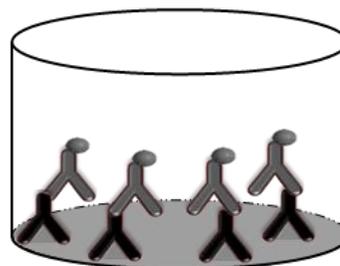
paredes de los pozos de la microplaca de ELISA y compite con las dioxinas, presentes en la muestra, por el Ac policlonal selectivo para 2378 TCDD, después de un lavado el complejo formado por la dioxina y el Ac R7598 es eliminado y solo queda en la placa el complejo formado por el Ag y el Ac R7598, al agregar el anticuerpo marcado enzimáticamente con peroxidasa (ARHRP) y dirigido al complejo formado por el antígeno y el anticuerpo R7598, se produce una respuesta cromogénica en presencia del sustrato (H_2O_2) y tetrametil bencidina, que es cuantificado espectrofotométricamente. La intensidad del color es inversamente proporcional a la cantidad de dioxinas presentes en la muestra (Figura 3).

El método que se describe en este capítulo utiliza un anticuerpo policlonal que reconoce específicamente al congénere 2378-TCDD que es el más tóxico, sin embargo, presenta una reacción cruzada con otros congéneres y like-dioxinas (Anexo 3) por lo que la concentración que se reporta es la suma de todos ellos, que se pueden comparar con los equivalentes tóxicos que se reportan en cromatografía (pg/g TEQ), aunque como el método utiliza el subrogado TMDD las unidades se reportan en equivalentes de TMDD (pg/g TMDD-EQ). El estudio realizado por García-Nieto *et al.* (2010), demuestra la aplicación de este inmunoensayo, al identificar fuentes potenciales en la generación de dioxinas en México, como es el caso de comunidades que viven en áreas palúdicas que han sido fumigadas con DDT y que utilizan leña para cocinar sus alimentos (2,419 a 5,967 pg/g TMDD-EQ), el área aledaña a la industria química (37 a 813 pg/g TMDD-EQ) y a una zona ex - fundidora de hierro y plomo (149 a 872 pg/g TMDD-EQ).

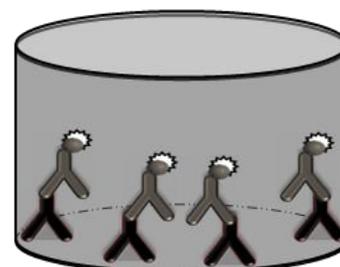
Esta metodología es una herramienta complementaria a los bioensayos de primer nivel para la identificación del peligro (PCDD) como primera etapa de la evaluación de riesgo en salud o ecotoxicológico. Permite conocer la magnitud de la contaminación, lo cual orienta al investigador para decidir si un sitio requiere evaluaciones específicas como extensión de la exposición, efectos en la biota e implicaciones en salud humana, así como la valoración de estrategias de prevención y remediación.



Ag 0626-BSA

Ag-Ac R7598
TCDD-Ac R7598

Ag-Ac R7598 -Ac ARHRP

Sustrato (TMB + H₂O₂)Figura 3. ELISA para
PCDD

OBJETIVO

Explicar detalladamente la metodología de ELISA para la cuantificación de dioxinas en suelo como una técnica complementaria a la HRGC/HRMS y conocer su aplicación en las evaluaciones ecotoxicológicas.

MATERIAL

Bolsa de plástico 2 kg
Caja de madera con luz UV
Columnas de filtración de 12 ml
Cubiertas p/placas de 96 pozos
Embudo de filtración tallo corto 6 cm diámetro externo
Espátula
Frasco de vidrio ámbar 500 y 1000 ml
Frascos de plástico 1000 ml
Garrafón de plástico 5 L
Gradillas (para tubo de 2, 15, 35 y 70 ml)
Guantes de nitrilo
Matraz Kitasato 4 L con tapón de goma
Manguera PVC 1/4" 5/16" y 3/8" diámetro interno
Matraz Erlenmeyer 50 y 125 ml
Matraz Erlenmeyer con tapón esmerilado 250 ml
Matraz volumétrico 250, 500 y 1000 ml
Micropipeta automática/puntas 0.5-10 µl y 5.0-40 µl,
Micropipeta automática/puntas 0.2-1.0 ml y 20-200 µl
Micropipeta multicanal 50 – 300 µl
Picetas para agua y acetona
Pipetas Pasteur y bulbos
Placas de dilución de 96 pozos
Placas de ensayo de 96 pozos
Probeta 25, 50 y 100 ml
Recipiente para soluciones para multicanal (RM)
Tubos cónicos 20 x 118 mm (15 ml)
Tubos de ensayo 20 x 150 mm (35 ml) con y sin tapa
Viales color ámbar con inserto 2 ml

EQUIPO

Agitador orbital
Agitador Vórtex
Balanza analítica
Bomba de vacío
Cámara de vacío
Campana de extracción
Estufa a 37 °C
Evaporador
Lavador manual
Lector de ELISA
Tanque para nitrógeno
Placa de agitación
Potenciómetro
Refrigerador
Sonicador
Ultracongelador -80°C

REACTIVOS

Nombre	Marca	Catálogo
Acetona [CH ₃ (CO)CH ₃]	JTB	9006-03
Ácido acético (C ₂ H ₄ O ₂)	JTB	9524-33
Ácido clorhídrico (HCl)	JTB	9530-33
Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	JTB	9681-05
Albúmina de suero bovino (BSA)	SIGMA	A-3059
Bicarbonato de sodio anhidro, (NaHCO ₃)	JTB	3506-20
Carbonato de sodio anhidro (Na ₂ CO ₃)	JTB	3602-01
Citrato de sodio [Na ₃ C ₃ H ₅ O (COO) ₃ 2H ₂ O]	JTB	3646-01
Cloruro de potasio (KCl)	JTB	3040-01
Cloruro de sodio (NaCl)	JTB	3624-01
Dimetil sulfóxido (DMSO)	SIGMA	D-8418
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	JTB	3246-01
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	JTB	3828-01
Hexano grado HPLC (C ₆ H ₁₄)	JTB	9304-03
HRP Labeled goat anti-rabbit Ig (AR-HRP) opción 1	PHARMINGEN	554021
HRP Labeled goat anti-rabbit Ig (AR-HRP) opción 2	MILLIPORE	AP187P
Nitrógeno 99 % de pureza (N ₂ gaseoso)	INFRA	
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) al 30%	JTB	2186-01
Polisorbato 20 (Tween 20)	SIGMA	P-7949
Sand White Quartz 50 + 70 mesh	SIGMA	S-9887
Sílica gel 70-250 mesh (63-200 μ, diámetro 60 A°)	SIGMA	S-2509
Sulfato de sodio anhidro (Na ₂ SO ₄)	JTB	3891-01
Tetrametilbencidina (TMB)	SIGMA	T-2885
Tritón X-100 (TX)	SIGMA	X-100
Antígeno 7,8.-Diclorobenzo[5,6],[1,4] dioxino, [2,3-b] piridina-3-ácido carboxílico (0626-BSA) 9.2 mg/ml	Donado	
Anticuerpo Anti-JRS6-LPH, Kd=1x10 ⁻¹⁰ M (R-7598)	Donado	
TMDD en DMSO 100 μg/ml (3 metil, 4,7,8.-Triclorodibenzo-p-dioxina)	Donado	

PREPARACIÓN DE REACTIVOS**Amortiguador de fosfatos (PBS)**

NaCl	1.38 M	80 g
KH ₂ PO ₄	0.015 M	2 g
Na ₂ HPO ₄	0.025 M	11.49 g
KCl	0.027 M	2 g

Disolver los reactivos en agua desionizada, ajustar el pH a 7.5 y aforar a 1000 ml. Para el ensayo de ELISA realizar una dilución 1:10. Disolver 100 ml de PBS concentrado en 850 ml de agua desionizada, ajustar el pH a 7.5 y aforar a 1 L. Almacenar ambas soluciones en frasco de plástico a temperatura ambiente por un periodo máximo de 3 meses.

Amortiguador de PBS-Tween 20 (PBST al 0.05 %)

Disolver 100 ml de PBS concentrado y 0.5 ml de Tween 20 en agua desionizada, ajustar el pH a 7.5 y aforar a 1 L. Almacenar en frasco de plástico a temperatura ambiente, por un periodo máximo de 1 mes.

Agua Tween 20 (AT20 al 0.05 %)

Disolver 0.5 ml de Tween 20 en 1 L de agua desionizada. Almacenar en garrafón de plástico a temperatura ambiente, por un periodo máximo de 3 meses.

Amortiguador de carbonato y bicarbonato (ACB)**Na₂CO₃ 0.015 y NaHCO₃ 0.035 M**

Mezclar 0.795 g de carbonato de sodio anhidro y 1.465 g de bicarbonato de sodio anhidro en agua desionizada, ajustar el pH a 9.6 con HCl y aforar a 500

ml. Almacenar en frasco de plástico a 4°C, máximo por 3 meses.

Amortiguador de citrato (ACS 100 mM)

Disolver 13.61 g de citrato de sodio en agua desionizada, ajustar el pH a 5.5 con ácido acético y aforar a 1 L. Almacenar en frasco de plástico a 4 °C, por 3 meses.

Solución cromógena (TMB al 0.6 %)

Disolver 0.012 g de tetrametil bencidina en 2 ml de DMSO. Almacenar en frasco de vidrio ámbar a temperatura ambiente hasta un mes.

DMSOT al 0.01 %

Añadir 10 µl de Tritón X-100 en 100 ml de DMSO. Almacenar a temperatura ambiente y en frasco de vidrio color ámbar, por un periodo máximo de 3 meses.

Ácido sulfúrico (H₂SO₄ 2 M)

Medir 26.65 ml de ácido sulfúrico y aforar a 250 ml. Almacenar en frasco de vidrio color ámbar a temperatura ambiente, por un periodo máximo de 3 meses.

TMDD 1 µg/ml

Diluir en un vial color ámbar 10 µl de TMDD de una concentración de 100 µg/ml en 990 µl de DMSOT. Conservar en el desecador por un mes.

TMDD 20,000 pg/ml

Disolver en un tubo de ensayo 8 µl de TMDD de 1 µg/ml en 392 µl de DMSOT, justo antes de su uso.

Antígeno 0626-BSA (1:14000 = 0.65 µg/ml)

Diluir 2 µl del antígeno 0626-BSA de una concentración de 9.2 mg/ml en 28 ml del amortiguador ACB en un matraz Erlenmeyer, agitar por rotación sobre la mesa de trabajo. Se prepara justo antes de su uso.

Amortiguador de fosfatos con albúmina de suero bovino (PBSB al 0.5 %)

Disolver 0.150 g de BSA en 30 ml de PBS en un matraz Erlenmeyer, agitar por rotación sobre la mesa de trabajo. Se prepara al inicio de la etapa de bloqueo.

Amortiguador de fosfatos con albúmina de suero bovino (PBSB al 0.2 %)

Disolver 4 ml de PBSB al 0.5 % con 6 ml de PBS en un matraz Erlenmeyer, agitar por rotación sobre la mesa de trabajo. Se prepara justo antes de su uso.

Anticuerpo R7598

(1:3000)

Mezclar 6 ml de la solución de PBSB 0.2 % con 2 µl del Ac R7598 en un matraz por rotación sobre la mesa. Preparar justo antes de su uso.

Sílica activada

Colocar 20 g de sílica gel en un vaso de precipitado, cubrir con papel aluminio perforado y calentar a 170 °C durante 24 h. Almacenar en desecador hasta por 1 semana. Alcanza para 6 columnas de extracción en fase sólida (SPE)

Sílica acidificada

(Si-H₂SO₄ al 44 %)

Mezclar 10 g de sílica gel activada con 4.3 ml de ácido sulfúrico en un frasco de vidrio ámbar agitar hasta eliminar los grumos. Preparar la cantidad que se va a utilizar y desechar el sobrante.

Columnas SPE para limpieza

Colocar un filtro circular en el fondo de la columna SPE, se pueden utilizar de 12 o 20 ml, añadir 0.5 g de sílica activada, seguido por 2 g de $\text{Si-H}_2\text{SO}_4$ al 44 %, 1 g de sílica activada y 1 g de sulfato de sodio anhidro, colocar al final un filtro circular. Preparar el mismo día que se utilizarán (Figura 4).



Activar a 170 °C 24 h



Agitar sílica acidificada



Almacenar al vacío



Figura 4. Preparación de columnas SPE para limpieza

METODOLOGÍA

Extracción

Mezclar 10 g de suelo o sedimento con 1 g de arena de cuarzo blanca y 30 ml de hexano en un matraz Erlenmeyer, colocar el tapón y cubrir con una capucha de papel kraft (estruza) y aluminio sujetando con una liga, revolver durante 3 h en el agitador orbital, realizar una segunda extracción con 25 ml de hexano y 1 h de agitación. Otra opción es, mezclar 1 g de la muestra con 10 ml de hexano (por triplicado) en un tubo de ensayo y sonicar durante 15 min cada vez,

mezclando con Vórtex antes de cada sonicación. Después de cualquiera de los dos procesos de extracción que se haya elegido, filtrar el extracto empleando papel filtro Whatman No. 1, recuperar los extractos en el mismo tubo de ensayo (Figura 5).

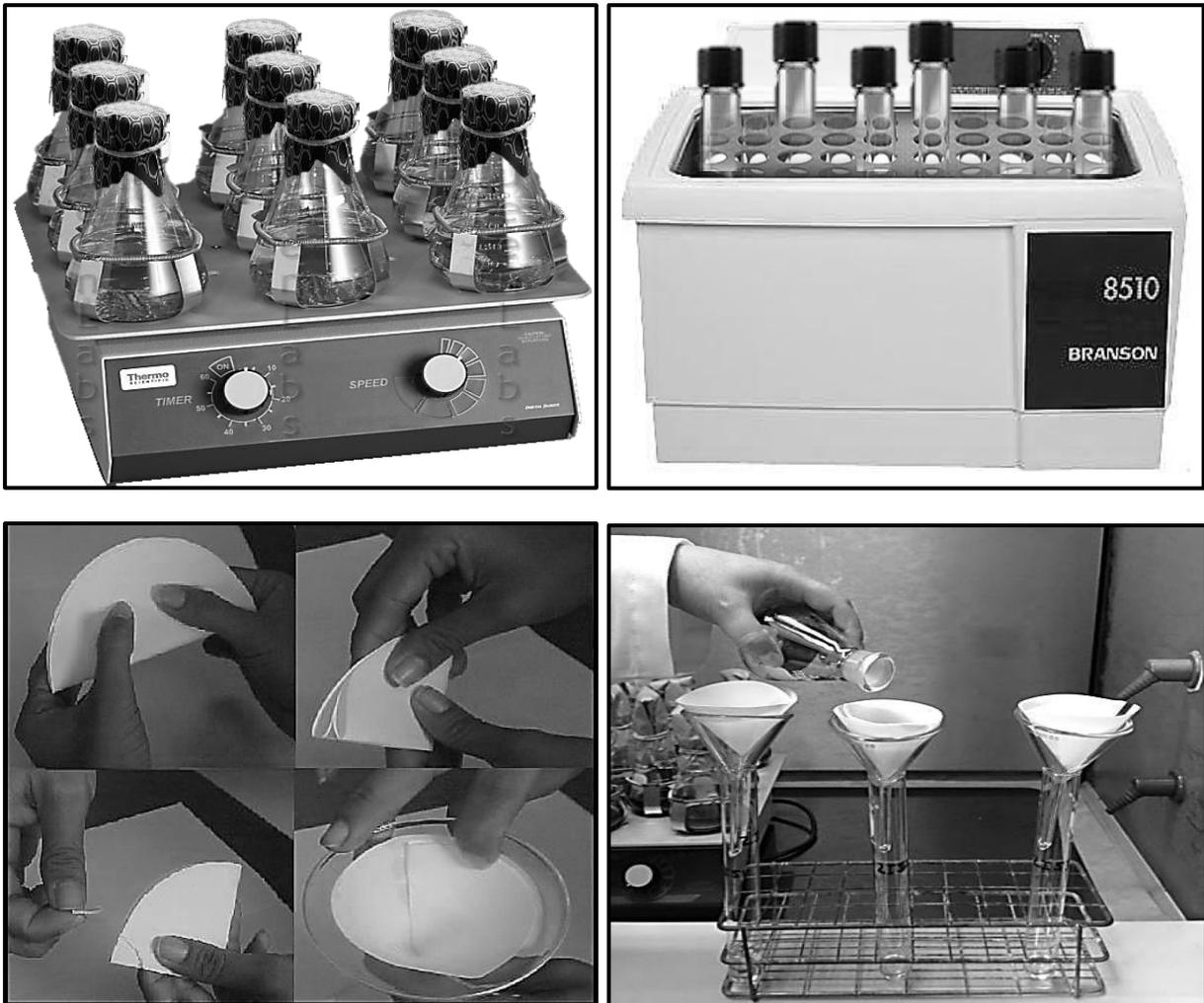


Figura 5. Extracción por agitación o sonicación

Primera evaporación

Vaciar el extracto en tubos cónicos de 15 ml y colocarlos en el evaporador, aplicar una corriente suave de nitrógeno, evaporar el hexano hasta 2 ml aproximadamente (Figura 6).

Limpieza

Colocar las columnas de SPE en la cámara de vacío, activar cada columna adicionando 6 ml de hexano, transferir con pipeta Pasteur los 2 ml del extracto y eluir con 40 ml de hexano en etapas de 10 ml. Evitar que la columna se seque (Figura 7).

Segunda evaporación

Evaporar con nitrógeno hasta 10 ml, añadir 500 μ l de DMSOT y continuar la evaporación hasta 0.5 ml. Transferir el extracto a un vial color ámbar de 2 ml. Enjuagar el tubo cónico con 500 μ l de DMSOT y transferirlo al mismo vial. Almacenar a 4°C (Figura 8).

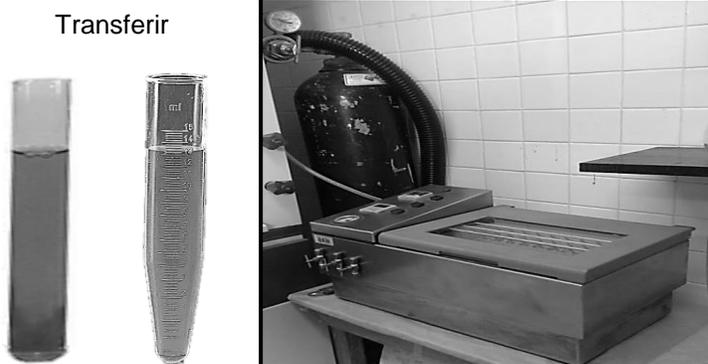


Figura 6. Primera evaporación con nitrógeno

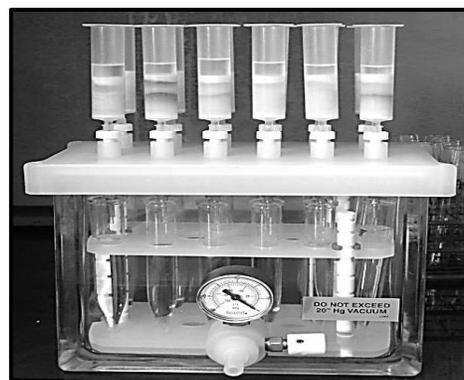


Figura 7. Limpieza por columnas de filtración multicapas



Evaporar a 10 ml, añadir 500 μ l DMSOT y terminar de evaporar



Transferir



Añadir 500 μ l DMSOT y almacenar

Figura 8. Segunda evaporación y recuperación en DMSOT

Etapa de revestimiento (Ag 0626-BSA 0.65 µg/ml)

El antígeno 0626-BSA se inmoviliza por adsorción directa a los pozos de la microplaca de ELISA. Vaciar en un recipiente RM y añadir 100 µl en cada pozo de una microplaca de ELISA, cubrir la microplaca con tira adherente e incubar 24 h a 4 °C (Figura 9).

Lavar 5 veces con AT20 mediante succión y expulsión con un lavador manual hasta eliminar completamente la solución, depositándola en el matraz Kitasato No. 1 (Figura 11).



Figura 9. Revestimiento



Figura 11. Bloqueo

**Etapa de bloqueo
(PBSB al 0.5 %)**

En esta etapa se adiciona la proteína albúmina de suero bovino para cubrir los sitios de unión instaurados (espacios que quedan entre un Ag y otro) de la superficie de los pozos de la microplaca. Vaciar en un recipiente RM la solución de PBSB al 0.5 % recién preparada y adicionar 200 µl en cada pozo de la microplaca con una micropipeta multicanal, cubrir la microplaca con tira adherente e incubar 30 min a temperatura ambiente (≈25 °C) (Figura 11).

Lavar 5 veces con AT20 mediante succión y expulsión con un lavador manual hasta eliminar completamente la solución, depositándola en el matraz Kitasato No. 1 (Figura 10).



Figura 10. Lavado manual de microplaca de ELISA

Preparación de la curva estándar de TMDD y diluciones de los extractos de suelo o sedimento

Vaciar 5 ml de PBS en un recipiente RM y con micropipeta multicanal, añadir 100 μ l en los pozos B1 al B12, E1 al E12, G4, G5, G6, G10, G11 y G12 de una microplaca para diluciones (Figura 12).

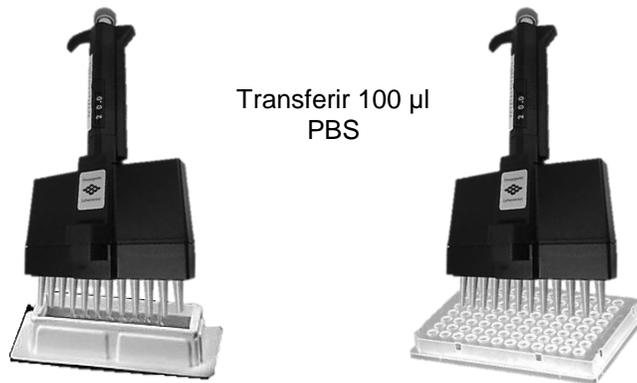


Figura 12. Adición de PBS en la microplaca para diluciones

Preparar 10 concentraciones seriales de TMDD a partir de la concentración de 20,000 μ g/ml, en una proporción de 50 % de DMSOT-PBS. El primer punto de la curva tiene una concentración de 10,000 μ g/ml y la última de 0.128 μ g/ml. Para preparar la curva estándar de TMDD se utilizan las filas A y B. Adicionar DMSOT en los pozos A2 al A12 en las cantidades indicadas, añadir 300 μ l de TMDD 20,000 μ g/ml en el pozo A1 y transferir hasta el pozo A10 las cantidades señaladas, los pozos A11 (blanco de TMDD) y A12 (blanco de TMDD y anticuerpo) no llevan TMDD. Mezclar 8 veces con la micropipeta multicanal por succión y expulsión antes de cada transferencia. Succionar 100 μ l de los pozos de la fila A y colocarlos en los pozos de la fila B, mezclar con la micropipeta.

Cada extracto de suelo o sedimento se analiza en tres diluciones, generalmente se eligen las diluciones 1:50, 1:100 y 1:200, sin embargo, dependiendo de los resultados se ajustará la dilución

Cada microplaca alcanza para realizar las diluciones de 6 extractos. Añadir DMSOT en las filas D y F en los volúmenes indicados. Agregar la cantidad de extracto que se indica en los pozos D1 (1:10), D4 (1:50), D7 (1:100), D10 (1:200), F4 (1:50) y F10 (1:200), se puede elegir la misma dilución para los seis extractos.

Mezclar 8 veces en cada pozo por succión y expulsión con la micropipeta multicanal, transferir 150 μ l a los dos pozos consecutivos para obte-

ner dos diluciones más de cada extracto: D2 (1:20), D3 (1:40); D5 (1:100), D6 (1:200); D8 (1:200), D9 (1:400); D11(1:400), D12 (1:800), F5 (1:100), F6 (1:200), F11(1:400) y F12 (1:800). Mezclar y transferir

100 µl de los pozos de las filas D y F a las filas E y G, respectivamente (Figura 13).

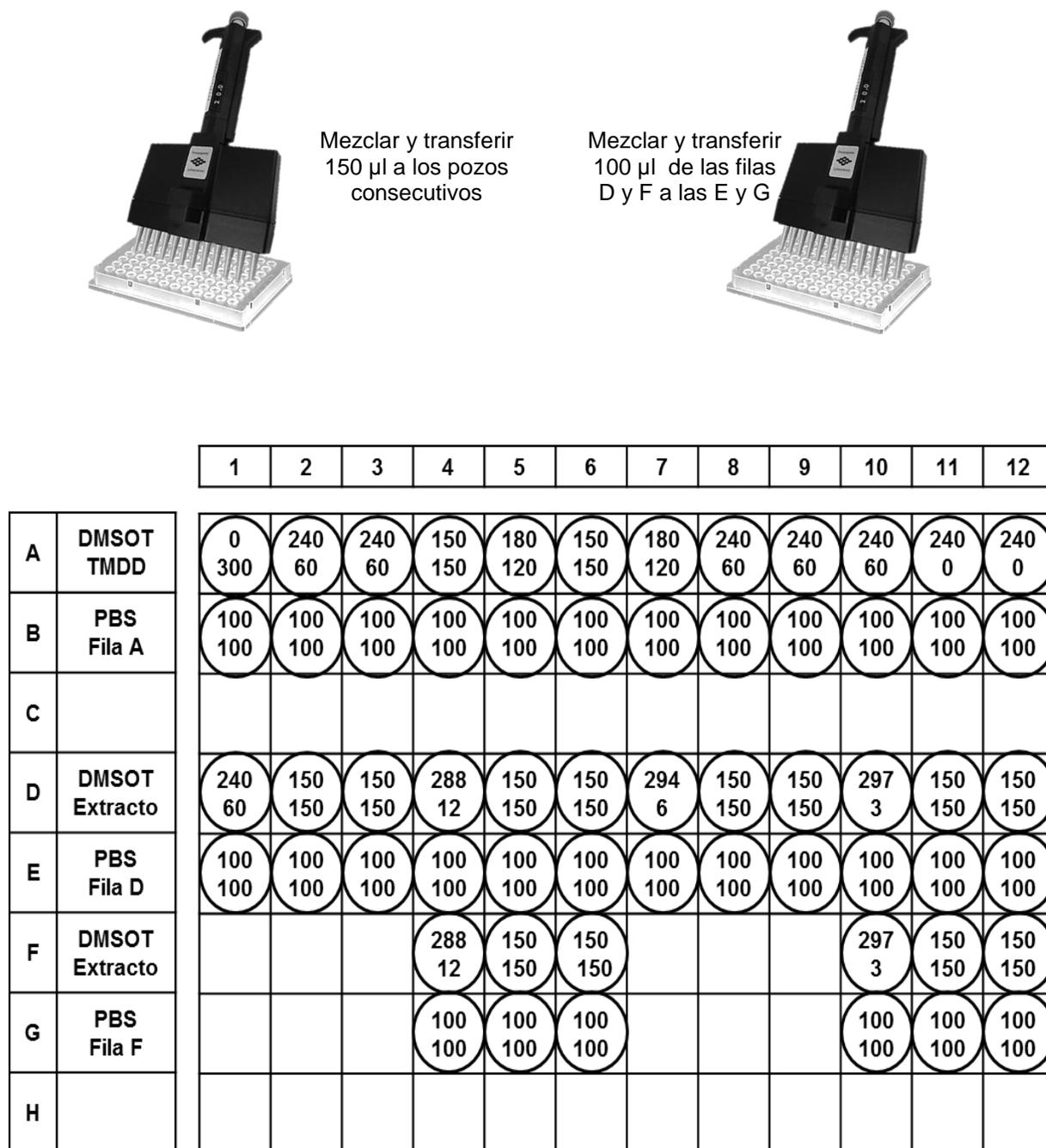


Figura 13. Microplaca de dilución: preparación de la curva de TMDD y diluciones de los extractos

Etapas de competencia

El antígeno 0626-BSA y las dioxinas (muestra) o el TMDD (curva estándar) compiten por la unión al anticuerpo R7598. Transferir por triplicado 50 µl de cada estándar de la curva (fila B) y cada dilución de los extractos (fila E y G) preparados en la microplaca de dilución a la microplaca de ELISA. En esta última utilizar los pozos de las filas A, B, y C para la curva estándar de TMDD y los pozos de las filas D, E, F, G y

H, para los extractos. Las concentraciones de cada punto de la curva y las diluciones de los extractos se indican en la Figura 14. Mezclar 8 veces con la micropipeta justo antes de la transferencia.

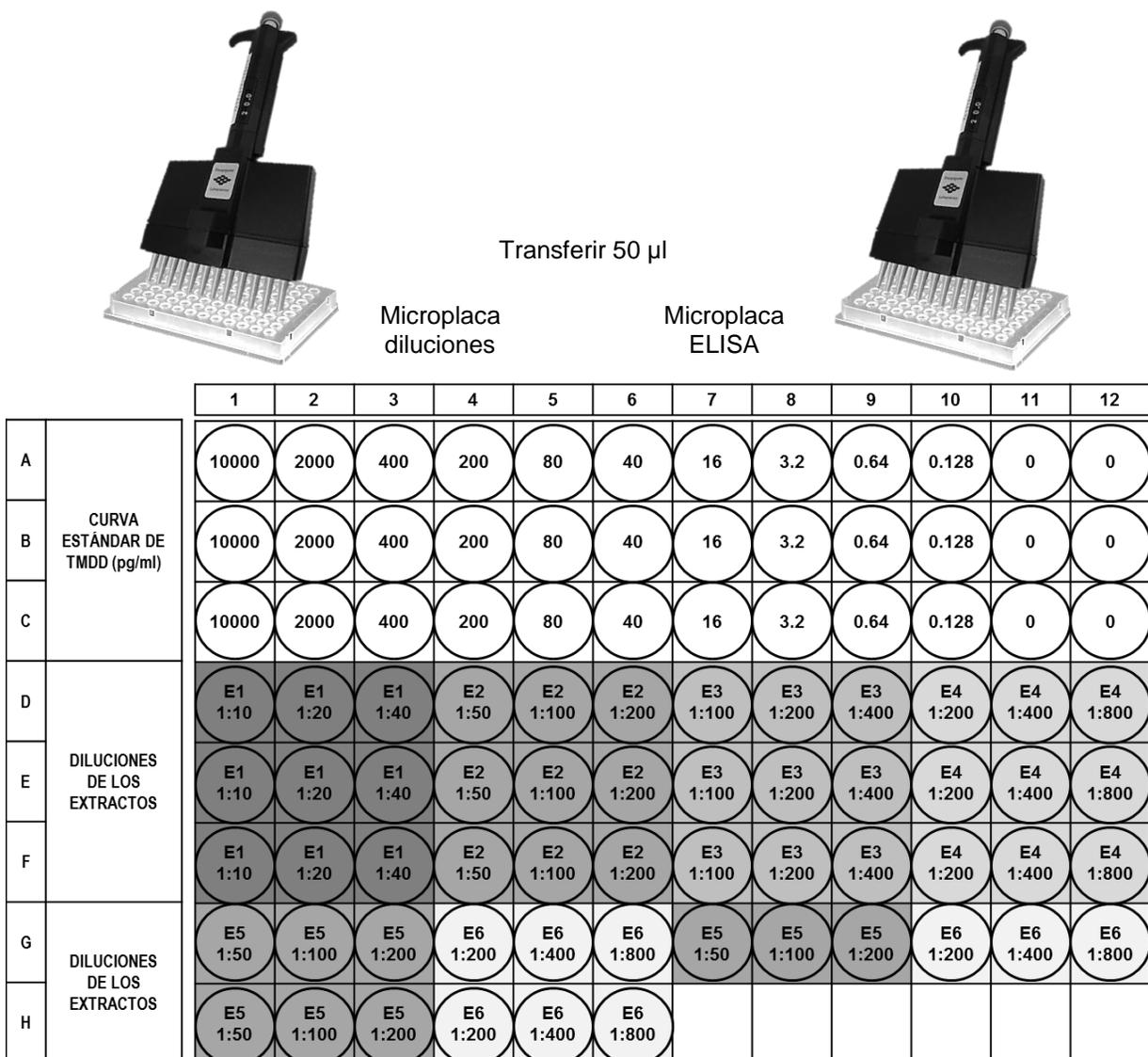


Figura 14. Microplaca de ELISA: adición de la curva estándar y las diluciones de los extractos

Vaciar el anticuerpo R7598 en el recipiente RM y transferir 50 μ l a todos los pozos de la microplaca de ELISA excepto a los pozos 12A, 12B y 12C (blanco de anticuerpo), a éstos adicionar 50 μ l de PBSB al 0.2 % (Figura 15). Cubrir con tira adhesiva e incubar a 25 °C durante 90 min. Lavar 5 veces con AT20 mediante succión y expulsión recolectando la solución en el matraz Kitasato No. 2 adaptado con filtro de carbón activado (Figura 10). Sacudir fuertemente la placa sobre papel absorbente en la mesa de trabajo.



Figura 15. Adición Ac R7598



Figura 16. Adición Ac ARHRP

Etapas de amplificación

El Anticuerpo ARHRP se une al complejo formado por el antígeno 0626-BSA y el anticuerpo R7598. Mezclar en un matraz Erlenmeyer, 12 ml de PBST y 4 μ l del anticuerpo ARHRP, agitar por rotación sobre la mesa. Vaciar en un recipiente RM y transferir 100 μ l en cada pozo de la microplaca de ELISA. Cubrir con tira adherente e incubar durante 60 min a temperatura ambiente (Figura 16). Lavar 5 veces con AT20 mediante succión y expulsión con el lavador manual hasta eliminar completamente la solución, pasar el desecho por carbón activado adaptado sobre el matraz Kitasato No. 2 (Figura 10). Sacudir fuertemente la placa sobre papel absorbente en la mesa de trabajo.

Etapa cromógena

La enzima peroxidasa del anticuerpo ARHRP reacciona con el sustrato (H_2O_2) en presencia de un cromógeno (tetrametil bencidina). En un matraz Erlenmeyer disolver 240 μ l de TMB y 2 μ l de H_2O_2 al 30 % en 15 ml del amortiguador de citratos. Vaciar en un recipiente RM, adicionar 100 μ l en cada pozo de la microplaca de ELISA, cubrir la microplaca con papel aluminio e incubar 10 min a temperatura ambiente.

Añadir 50 μ l de H_2SO_4 2M en cada pozo, para detener la reacción. Colocar la microplaca en el lector de ELISA y realizar la lectura de densidad óptica en longitud de onda dual 450-655 nm (Figura 17).



Figura 17. Adición del sustrato y lectura de la densidad óptica en el lector de microplaca

Análisis de los datos

Los valores de densidad óptica (DO) se grafican en el eje de las ordenadas (escala lineal) en contra de las concentraciones de los estándares de TMDD en las abscisas (escala logarítmica) lo que produce una curva dosis-respuesta sigmoidea (Figura 18). La curva está construida usando los 4 parámetros logísticos (Ecuación I).

(Ec. I)
$$y = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} + D$$

(Ec. II)
$$x = \sqrt[B]{\frac{A - D}{y - D}} \times C$$

Donde:

x = concentración de dioxinas en la muestra.

A = valor máximo de la densidad óptica (x=0).

B = representa la pendiente y el rango lineal de la curva.

C = representa la concentración de TMDD, la cual inhibe en un 50 % la reacción Ag-Ac.

D = valor mínimo de la densidad óptica.

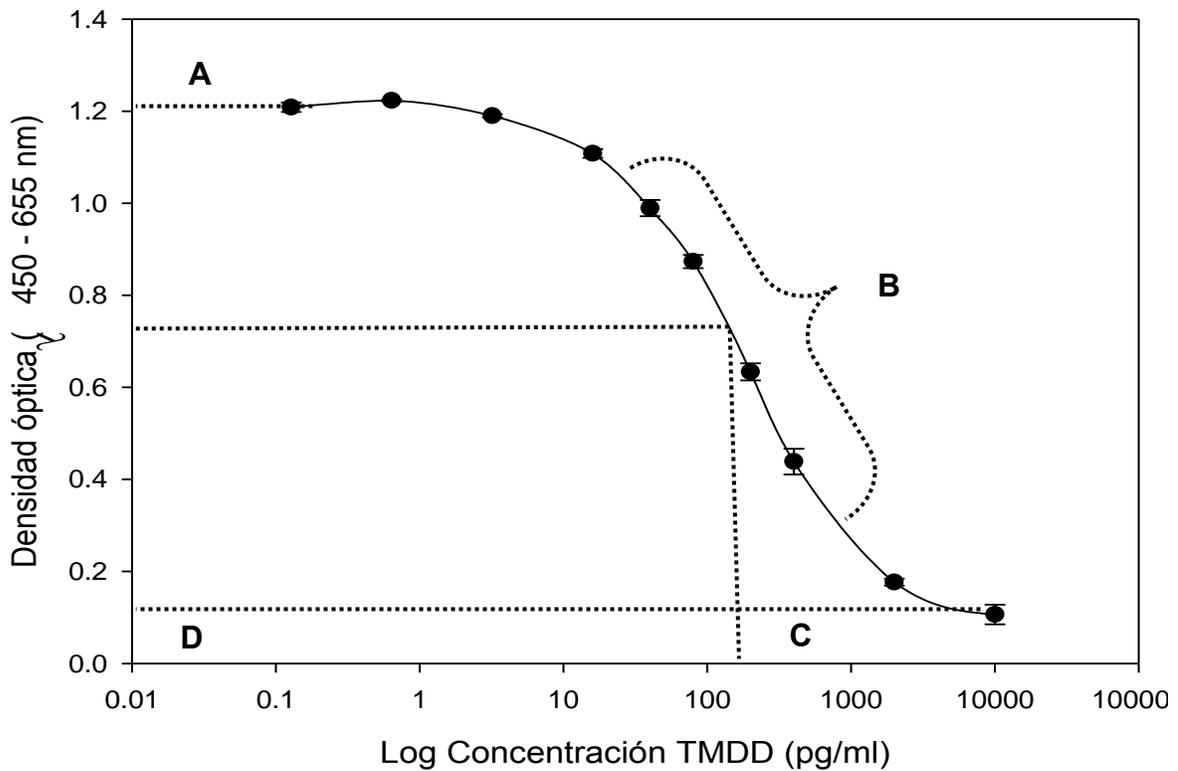


Figura 18. Curva sigmoidea de 4 parámetros logísticos. Esta gráfica representa el promedio de tres curvas realizadas de manera independiente. Cada punto es el promedio y las barras la desviación estándar

Las densidades ópticas de la curva y de las muestras se capturan en una plantilla de Excel, se calcula la media y desviación estándar (Anexo 4). Los datos de la curva se ingresan en el paquete estadístico de SIGMA-PLOT versión 11 para obtener la gráfica y los 4 parámetros logísticos: A, B, C y D, mediante el algoritmo de Levenberg–Marquardt a través de la técnica de los mínimos cuadrados ponderados (Anexo 5). Los parámetros se copian en la plantilla de Excel, la cual está construida con las fórmulas para obtener el valor de x por interpolación de la curva (ecuación II), se indica el factor de dilución en las celdas correspondientes para cada muestra y se obtiene la concentración de dioxinas de la muestra original. Si la DO de la muestra es demasiado alta se diluye hasta que la DO se encuentre dentro del rango cuantitativo del ensayo (parte lineal de la curva sigmoidea).

Control de calidad

Se emplea un estándar de referencia de suelo (BCR 529, EUR 18863 EN) con una concentración de 6,650 pg/g TEQ. Además de una muestra compuesta de suelo analizada por HRGC/HRMS con una concentración de 220 pg/g TEQ, como una segunda referencia. La exactitud se estima como el porcentaje de error obtenido al comparar la concentración teórica con la experimental.

Para la precisión se calcula el porcentaje del coeficiente de variación obtenido del IC50 (parámetro C de la curva de calibración) después de realizar la cur-

va por triplicado y en tres días diferentes. Para la repetibilidad y reproducibilidad se analiza una muestra por triplicado en la misma microplaca, tres veces en un solo día (repetibilidad), durante tres días (reproducibilidad). Los resultados se evalúan al calcular el porcentaje del coeficiente de variación.

Se recomienda confirmar por HRGC/HRMS las muestras con niveles altos de dioxinas.

Manejo de Residuos

Todo el trabajo se desarrolla en un área de seguridad, durante la noche el área es irradiada con luz ultravioleta (UV).

El material desechable es almacenado bajo luz UV y los líquidos del lavado se pasan por filtros de carbón activado.

LITERATURA CITADA

- ATSDR. 1998. Toxicological profile for chlorinated dibenzo-p-dioxins. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services.
- Birnbaum LS. 1994. The mechanism of dioxin toxicity: relationship to risk assessment. *Environ Health Perspec* 102 (9):157-63.
- De Rosa CT, Brown D, Dhara R, Garrett W, Hansen H, Holler J, Jones D, Jordan-Izaguirre D, O'Connor R, Pohl H, Xintaras C. 1997. Dioxin and dioxin-like compounds in soil part II: technical support document for ATSDR interim policy guideline. *Toxicol Ind Health* 13(6):769-804.
- DiGangi J, Petrlik J. 2005. The egg report. Contamination of chicken eggs from 17 countries by dioxins, PCBs and hexachlorobenzene. IPEN.
- Friedler H. 1999. Dioxin and furan inventories, National and regional emissions of PCDD/PCDF. UNEP. IOMC.
- García-Nieto E, Nichkova M, Yáñez L, Costilla-Salazar R, Torres-Dosal A, Gee SJ, Hammock BD, Juárez-Santacruz L, Díaz-Barriga F. 2010. Assessment of dioxin soil contamination in Mexico by enzyme-linked immunosorbent assay. *Arch Environ Contam Toxicol* 58(4):918-26.
- Kazlauskas A, Poellinger L, Pongratz I. 2000. The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. *J Biol Chem* 275 (52): 41317-24.
- Maíz P, Morales S. 2012. Inventario de Liberaciones de Dioxinas y Furanos – México 2004 –Revisión 2012 e Identificación de Fuentes Prioritarias de Liberación de Dioxinas y Furanos”. En: Memorias del Sexto Taller sobre fuentes y medición de dioxinas, furanos y hexaclorobenceno. Sesión 2: Inventario de emisiones, identificación de fuentes y modelación de dioxinas, furanos y hexaclorobenceno. México, 13 y 14 de Nov. Grupo de tarea de dioxinas, furanos y hexaclorobenceno, Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte. Disponible en: <http://www.ine.gob.mx/cenica-memorias/1121-taller-dfh-2012>. Último acceso: 19/09/13. INEGI 2010. <http://www.inegi.gob.mx>.
- Nichkova M, Park EK, Koivunen ME, Kamita SG, Gee SJ, Chuang J, Emon JM, Hammock BD. 2004. Immunochemical determination of dioxins in sediment and serum samples. *Talanta* 63(5):1213-23.
- Santillo D, Fernandes A, Stringer R, Alcock R, Rose M, White S, Jones K, Johnston P. 2003. Butter as an indicator of regional persistent organic pollutant contamination: further development of the approach using polychlorinated dioxins and furans (PCDD/Fs), and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs). *Food Addit Contam* 20(3):281-90.
- Sugawara Y, Gee SJ, Sanborn JR, Gilman SD, Hammock BD. 1998. Development of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay based on polyclonal antibodies for the detection of polychlorinated dibenzo-p-dioxins. *Anal Chem* 70(6):1092-9.
- Sugawara Y, Saito K, Ogawa M, Kobayashi S, Shan G, Sanborn JR, Hammock BD, Nakazawa H, Matsuki Y. 2002. Development of dioxin toxicity evaluation method in human milk by enzyme linked immunosorbent assay: assay validation for human milk. *Chemosphere*. 46(9-10):1471-6.
- Ustarán-Cervantes JI. 2007. Actividades de habilitación para ayudar a México a cumplir con el Convenio de Estocolmo sobre COP. Bases para crear un laboratorio sub-regional de dioxinas y furanos. Donación TF-053710. Nacional Financiera, SNC. SEMARNAT.

ANEXO 1. Factor de equivalencia tóxica para compuestos “Like Dioxinas”

Congéneres PCDD	TEF (WHO/97)	Congéneres PCDF	TEF (WHO/97)	Congéneres PCB	TEF (WHO/97)
2378 TCDD	1	2378 TCDF	0.1	33'44' TCB 77	0.0001
12378 PeCDD	1	12378 PeCDF	0.05	344'5 TCB 81	0.0001
123478 HxCDD	0.1	23478 PeCDF	0.5	233'44' PeCB 105	0.0001
123789 HxCDD	0.1	123478 HxCDF	0.1	23'44'5 PeCB 114	0.0005
123678 HxCDD	0.1	123678 HxCDF	0.1	2'344'5 PeCB 118	0.0001
1234678 HpCDD	0.01	123789 HxCDF	0.1	2'344'5 PeCB 123	0.0001
OCDD	0.0001	234678 HxCDF	0.1	33'44'5 PeCB 126	0.1
		1234678 HpCDF	0.01	233'44'5 HxCB 156	0.0005
		1234789 HpCDF	0.01	233'44'5' HxCB 157	0.0005
		OCDF	0.0001	23'44'55' HxCB 167	0.00001
				33'44'55' HxCB 169	0.01
				22'33'44'5 HpCB 170	-
				22'344'55' HpCB 180	-
				233'44'55' HpCB 189	0.0001

ANEXO 2. Ejemplo de la obtención de Equivalentes Tóxicos

Like dioxinas	Concentración (pg/g)	TEF (WHO/97)	TEQ
2378 TCDD	530	1	530
12378 PeCDD	280	1	280
123478 HxCDD	1200	0.1	120
123789 HxCDD	325	0.1	32.5
23478 PeCDF	859	0.5	429.5
123478 HxCDF	333	0.1	33.3
123678 HxCDF	789	0.1	78.9
2'344'5 PeCB	10000	0.0001	1
2'344'5 PeCB	690	0.0001	0.069
33'44'5 PeCB	450	0.1	45
233'44'5 HxCB	258	0.0005	0.129
		Total (pg/g TEQ)	1250.4

ANEXO 3. Reactividad cruzada del anticuerpo policlonal

	CONGÉNERES	REACTIVIDAD CRUZADA (%)	
Surrogado	TMDD	100	
	1 CDD	<0.01	
	27 DiCDD	0.19	
	237 TriCDD	6.7	
	1378 TCDD	43	
	PCDD	1234 TCDD	0.01
		2378 TCDD	129
		12378 PeCDD	72.9
		123478 HxCDD	1
		1234678 HpCDD	0.3
OCDD		<0.01	
2378 TCDF		26	
PCDF	23478 PeCDF	9.0	
	12378 PeCDF	0.1	
	123678 HxCDF	5.4	
	123789 HxCDF	5.4	
	1234678 HpCDF	0.06	
	OCDF	<0.01	
	33'44' TCB (77)	0.10	
PCB	33'44'5 PeCB (126)	<0.01	
	33'44'55' HxCB (169)	<0.01	

ANEXO 4. Plantilla en Excel para calcular la concentración de PCDD

The screenshot shows a Microsoft Excel spreadsheet titled "ELISA-PLANTILLA [Modo de compatibilidad] - Microsoft Excel (Error de activación de productos)". The interface includes the standard Excel menu bar (Archivo, Inicio, Insertar, etc.) and a ribbon with various toolbars. The spreadsheet data is organized as follows:

2	CONC	DO STD	DO STD	DO STD	MEDIA	DESV. STD	C.V	LC
3	1000.0000				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2000.0000				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
5	400.0000				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
6	200.0000				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
7	80.0000				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
8	40.0000				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
9	16.0000				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
10	3.2000				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
11	0.6400				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
12	0.1280				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
13	0.0640				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
14	BLANCO				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
16	MUESTRA	DO	DO	DO	MEDIA	DESV. STD	C.V	D
17					#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	A
18					#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	C
19					#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	B
20					#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	Y
21					#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	LD
22					#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	Y
23					#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	LC
24					#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
25					#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
26					#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
27					#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
28					#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
29					#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
30	MUESTRA	CONC	CONC	CONC	MEDIA	DESV. STD	C.V	CONC. CORR. (ppt)
31	0.0000	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
32	0.0000	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
33	0.0000	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
34	0.0000	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
35	0.0000	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
36	0.0000	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
37	0.0000	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
38	0.0000	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
39	0.0000	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
40	0.0000	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
41	0.0000	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
42	0.0000	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

ANEXO 4. Continuación

CURVA ESTÁNDAR	DO	DO	DO	MEDIA	DE	C.V	I.C
10000.0000	0.1310	0.0940	0.0940	0.1063	0.0214	20.0896	0.0242
2000.0000	0.1690	0.1840	0.1770	0.1767	0.0075	4.2484	0.0085
400.0000	0.4080	0.4620	0.4460	0.4387	0.0277	6.3230	0.0314
200.0000	0.6290	0.6540	0.6180	0.6337	0.0184	2.9113	0.0209
80.0000	0.8840	0.8790	0.8570	0.8733	0.0144	1.6448	0.0163
40.0000	0.9710	1.0060	0.9910	0.9893	0.0176	1.7749	0.0199
16.0000	1.1050	1.1010	1.1190	1.1083	0.0095	0.8528	0.0107
3.2000	1.1910	1.1860	1.1930	1.1900	0.0036	0.3030	0.0041
0.6400	1.2210	1.2220	1.2260	1.2230	0.0026	0.2163	0.0030
0.1280	1.2000	1.2200	1.2060	1.2087	0.0103	0.8491	0.0116
0.0000	1.2370	1.2360	1.2220	1.2317	0.0084	0.6809	0.0095
BLANCO	0.0490	0.0480	0.0570	0.0513	0.0049	9.6095	

SUELOS	DO	DO	DO	MEDIA	DE	C.V	PARÁMETROS		
ANA 5 040602 s/c (1:50)	0.9210	0.9110	0.8870	0.9063	0.0175	1.9280	D	0.0732	
ANA 5 040602 s/c (1:100)	1.0300	1.0180	1.0210	1.0230	0.0062	0.6105	A	1.22	
ANA 5 040602 s/c (1:200)	1.0850	1.0860	1.1070	1.0927	0.0124	1.1370	C	184.98	
ANA 7 040602 s/c (1:100)	0.8100	0.8630	0.8220	0.8317	0.0278	3.3416	B	0.9404	
ANA 7 040602 s/c (1:200)	0.9920	1.0030	1.0100	1.0017	0.0091	0.9059	LÍMITE DE DETECCIÓN		
ANA 7 040602 s/c (1:400)	1.0660	1.0740	1.1070	1.0823	0.0217	2.0080	Y	1.2	
SALA 1 1°m 130802 s/c (1:200)	0.9040	0.9020	0.9220	0.9093	0.0110	1.2113	LD	2	
SALA 1 1°m 130802 s/c (1:400)	1.0000	0.9430	0.9780	0.9737	0.0287	2.9523	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN		
SALA 1 1°m 130802 s/c (1:800)	1.0690	1.0380	1.0140	1.0403	0.0276	2.6505	Y	1.1	
Ags 7 Nov03 c/c (1:200)	1.1820	1.1510	1.0690	1.1340	0.0584	5.1487	LC	10	
Ags 7 Nov03 c/c (1:400)	1.1840	1.1290	1.0950	1.1360	0.0449	3.9534	RANGO DE CUANTIFICACION		
Ags 7 Nov03 c/c (1:800)	1.2140	1.2010	1.1350	1.1833	0.0424	3.5797	Inhibición (%)	y	x
Ags 5 s/f s/c (1:200)	1.0432	0.9150	0.9590	0.9724	0.0651	6.6991	50	0.6158	207.2
Ags 5 s/f s/c (1:400)	1.1010	1.1340	1.0610	1.0987	0.0366	3.3273	20	0.2463	1160.0
Ags 5 s/f s/c (1:800)	1.1440	1.1610	1.1550	1.1533	0.0086	0.7475	90	1.1085	17.2
BCR 160703 c/c (1:100)	0.6350	0.6470	0.6170	0.6330	0.0151	2.3854	30	0.3695	567.4
BCR 160703 c/c (1:200)	0.7920	0.8460	0.7920	0.8100	0.0312	3.8490	80	0.9853	43.6

SUELOS	DO	DO	DO	MEDIA	DE	C.V	CONC/DIL	MEDIA (pg/g TMDD-EQ)	
ANA 5 040602 s/c (1:50)	60.9955	63.9714	71.4477	65.4715	5.3851	8.2252	65		
ANA 5 040602 s/c (1:100)	33.0948	35.8028	35.1182	34.6719	1.4081	4.0613	69		
ANA 5 040602 s/c (1:200)	21.6673	21.4737	17.5189	20.2199	2.3412	11.5786	81	72	
ANA 7 040602 s/c (1:100)	99.0924	79.4295	94.3735	90.9651	10.2650	11.2845	910		
ANA 7 040602 s/c (1:200)	41.9570	39.3042	37.6539	39.6383	2.1709	5.4768	793		
ANA 7 040602 s/c (1:400)	25.4393	23.8292	17.5189	22.2625	4.1862	18.8039	890	864	
SALA 1 1°m 130802 s/c (1:200)	66.1023	66.7185	60.7022	64.5077	3.3100	5.1312	1290		
SALA 1 1°m 130802 s/c (1:400)	40.0204	54.7182	45.4416	46.7267	7.4327	15.9068	1869		
SALA 1 1°m 130802 s/c (1:800)	24.8318	31.3338	36.7237	30.9631	5.9546	19.2314	2477	1879	
Ags 7 Nov03 c/c (1:200)	5.0734	9.8997	24.8318	13.2683	10.3009	77.6354	265		
Ags 7 Nov03 c/c (1:400)	4.7784	13.5978	19.7530	12.7098	7.5267	59.2197	508		
Ags 7 Nov03 c/c (1:800)	0.6586	2.3630	12.5672	5.1963	6.4400	123.9357	416	396	
Ags 5 s/f s/c (1:200)	30.2079	62.7716	50.3738	47.7844	16.4355	34.3952	956		
Ags 5 s/f s/c (1:400)	18.6274	12.7378	26.4620	19.2758	6.8850	35.7185	771		
Ags 5 s/f s/c (1:800)	11.0522	8.2926	9.2512	9.5320	1.4011	14.6990	763	830	
BCR 160703 c/c (1:100)	192.9891	184.5847	206.3356	194.6365	10.9687	5.6355	3893		
BCR 160703 c/c (1:200)	106.4928	85.4149	106.4928	99.4668	12.1694	12.2346	3979	3936	

ANEXO 5. Obtención de los 4 parámetros en SIGMA-PLOT

	1-Concentración TMDD (pg/ml)	2-Media DO	3-DE	4	5	6
1	10000.0000	0.1063	0.0214			
2	2000.0000	0.1767	0.0075			
3	400.0000	0.4387	0.0277			
4	200.0000	0.6337	0.0184			
5	80.0000	0.8733	0.0144			
6	40.0000	0.9893	0.0176			
7	16.0000	1.1083	0.0095			
8	3.2000	1.1900	0.0036			
9	0.6400	1.2230	0.0026			
10	0.1280	1.2087	0.0103			
11	0.0000	1.2317	0.0084			
12						
13						

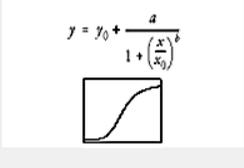
Statistics menu options:

- Run Current Test...
- Rerun Current Test...
- Current Test Options...
- Describe Data...
- Single Group
- Compare Two Groups
- Compare Many Groups
- Before and After
- Repeated Measures
- Rates And Proportions
- Regression
- Correlation
- Survival
- Normality...
- Power
- Sample Size
- Nonlinear Regression
 - Regression Wizard... F5
 - Dynamic Fit Wizard...
 - Global Curve Fit Wizard...

ANEXO 5. Continuación

Regression Wizard - Equation

Select the equation to fit your data



Equation Category: Sigmoidal

Equation Name: Sigmoid, 3 Parameter

Buttons: Save, Save As..., New..., Edit Code..., Help, Cancel, Back, Next, Finish

Regression Wizard - Variables

Select your dependent variable

Variable Columns: 2-Media DO

Variables: x : 1-Concentración TMDD, y : 2-Media DO

Data From: XY Pair

Buttons: Save, Save As..., Options..., Edit Code..., Help, Cancel, Back, Next, Finish

Regression Wizard - Fit Results

Converged in 13 iterations, tolerance satisfied.

Rsqr = 0.999516 Sum of squares = 8.883234e-4

Parameter	Value	StdErr	CV(%)	Dependencies
a	1.146e+0	1.495e-2	1.304e+0	0.9090759
b	9.406e-1	3.139e-2	3.337e+0	0.5497876
x0	1.850e+2	7.364e+0	3.982e+0	0.6490389
y0	7.321e-2	1.247e-2	1.703e+1	0.9257528

Buttons: Help, Cancel, Back, Next, Finish

Regression Wizard - Numeric Output Options

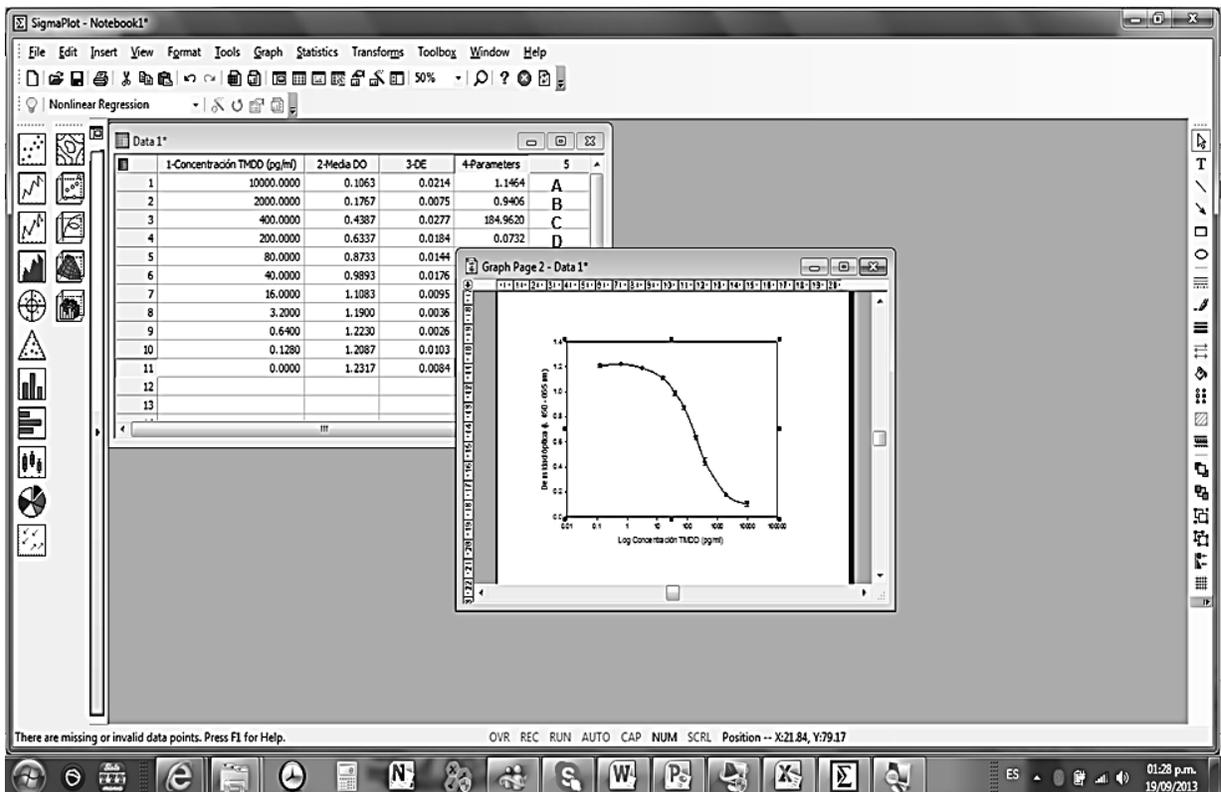
Select the columns for your results

Columns: First Empty

Results:

- Parameters: First Empty
- Predicted: First Empty
- Residuals: First Empty
- Create Report
- Add Equation to Notebook

Buttons: Save, Save As..., Report..., Help, Cancel, Back, Next, Finish



VARIABLES DE CRECIMIENTO, BIOMASA SECA Y PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS COMO INDICADORES DE FITOTOXICIDAD**INTRODUCCIÓN**

Las plantas son los seres vivos más importantes de los ecosistemas, su capacidad para realizar la fotosíntesis les confiere ser autótrofos, es decir, fabrican su propio alimento, además de producir oxígeno del que dependen otros integrantes del ecosistema (Figura 1). Sin embargo, los efectos negativos de la deforestación, incendios, inundaciones, la contaminación y en general las prácticas destructivas realizadas por el hombre constituyen una amenaza para el cumplimiento de sus funciones, entre las que destacan el controlar la erosión y ser hábitat para la fauna (refugio natural y de descanso para aves, murciélagos, ardillas, entre otras especies) (Evans y Furlong, 2003).

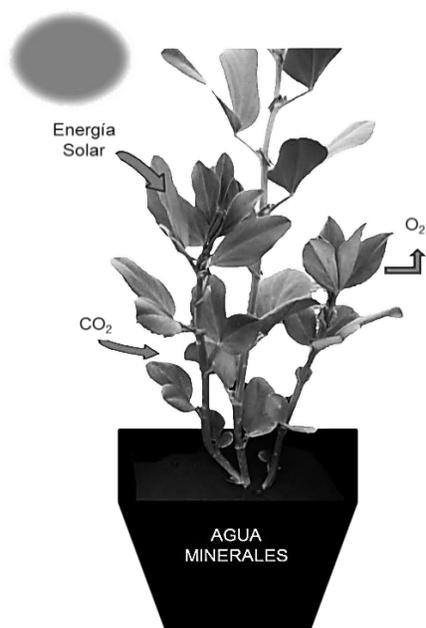


Figura 1. Componentes de la fotosíntesis

García-Gallegos E. 2013. Variables de crecimiento, biomasa seca y pigmentos fotosintéticos como indicadores de fitotoxicidad. En: *Evaluaciones ecotoxicológicas* (García-Nieto *et al.*) Universidad Autónoma de Tlaxcala, México. p. 67-81.

Las plantas también representan una ruta de exposición de contaminantes hacia animales y humanos, debido a que una vez que éstas los absorben pueden ser transferidos a la cadena trófica; por otro lado, pueden ser utilizadas como sujetos experimentales en bioensayos, por ser fácilmente manipulables (Evans y Furlong, 2003).

Para establecer los bioensayos con plantas, la Organización de Cooperación Económica y Desarrollo (OECD, por sus siglas en inglés) en 2006 señala que para seleccionar las especies vegetales a utilizar para evaluar la toxicidad de contaminantes ambientales se debe tomar en cuenta su diversidad taxonómica (dicotiledóneas o monocotiledóneas), la distribución y abundancia, ciclo de vida, importancia económica (ornamental y cultivo) o ecológica (nativas). Entre las especies con mayor sensibilidad para detectar el daño tóxico inducido por contaminantes se encuentra: la lechuga (*Lactuca sativa*), girasol (*Helianthus annuus*), zanahoria (*Daucus carota*), rábano (*Raphanus sativus*), pepino (*Cucumis sativus*), betabel (*Beta vulgaris*), soya (*Glycine max*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), chícharo (*Pisum sativum*), cebolla (*Allium cepa*), avena (*Avena sativa*), cebada (*Hordeum vulgare*), arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), sorgo (*Sorghum bicolor*) y maíz (*Zea mays*), sin embargo, esta lista se puede ampliar, siempre y cuando se garantice una germinación de la semilla por encima del 85 %. Los bioensayos con plantas permiten conocer los efectos tóxicos que provoca un contaminante,

valoran y determinan los factores de riesgo asociados a su exposición, así como el grado de tolerancia o sensibilidad de la planta, logran aportar una mayor certeza para vislumbrar el impacto ambiental, aunque no contundente, pero que se les puede considerar como bioindicadores ambientales (Visioli *et al.*, 2013).

Las actividades antrópicas han propiciado la degradación del suelo principalmente por la contaminación de metales pesados y compuestos orgánicos, tales como, hidrocarburos derivados del petróleo, plaguicidas y dioxinas, solos por citar algunos. Las pruebas ecotoxicológicas han sido intensamente discutidas como herramientas complementarias a los análi-

sis químicos que caracterizan el riesgo en sitios contaminados. Una de las pruebas ecotoxicológicas es la fitotoxicidad, la cual se define como la inhibición del crecimiento de la planta o cualquier efecto adverso causado por sustancias tóxicas o mezcla de ellas (Baumgarten y Spiegel, 2004).

Es una exposición aguda de 10 a 15 días en la que se exponen directamente las semillas al suelo/sedimento/abono orgánico (tratamiento único) o a sus diluciones (tratamientos múltiples), para evaluar la inhibición de la germinación y variables de crecimiento temprano de las plántulas (Cuevas, 2008). El número de variables se ha incrementado, lo que ha permitido obtener más información acerca del daño que provocan los contaminantes a la plántula, entre las variables que se han reportado están: 1) en leguminosas la cuantificación del número de nódulos radiculares (García *et al.*, 2012) y la presencia/ausencia de leghemoglobina (Weaver y Frederick, 1982), 2) la mortalidad (toxicidad aguda) de las plántulas, 3) longitud de la radícula y del hipocótilo/epicótilo, 4) la producción de biomasa, 5) la concentración de pigmentos fotosintéticos, 6) la tasa fotosintética (Fernández *et al.*, 2006), 7) la presencia/ausencia de necrosis en la radícula o raíz (Escoto *et al.*, 2007), 8) el nivel de lignificación de la raíz y 9) viabilidad y muerte celular de la raíz (Li *et al.*, 2012).

La mayor parte de los reportes sobre bioensayos fitotóxicos evalúan los efectos sobre el índice de ger-

minación, longitud de la radícula e hipocótilo/epicótilo, debido a que en estas etapas ocurren numerosos procesos fisiológicos, en los que la presencia de contaminantes puede interferir y/o alterar el crecimiento y desarrollo normal de las plántulas (Uribe, 2008); por otra parte, variables como la producción de biomasa seca indica la eficiencia del uso de la radiación solar que se transforma en energía química; pero el tipo de suelo, la concentración de nutrientes, el grado de contaminación y tipo de contaminante, el clima, la temperatura y el estrés hídrico, son factores que intervienen en su producción, si existe una mayor producción se obtendrá un mayor rendimiento de la planta y viceversa, para utilizarse

como una variable de toxicidad deben controlarse las variables antes mencionadas (García *et al.*, 2009). Los pigmentos fotosintéticos como la clorofila *a*, *b* y carotenos proporcionan información de los efectos toxicológicos de contaminantes ambientales; como suelos contaminados por metales pesados donde las plantas sufren estrés, el cual se caracteriza por la reducción de enzimas que intervienen en la biosíntesis de clorofila, lo que induce la inhibición de la fotosíntesis y que se traduce a una disminución en la concentración de pigmentos fotosintéticos, debido principalmente a que el ion central Mg^{+2} de la molécula de clorofila es sustituido por Cu^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} o Hg^{+2} , lo cual impide la captura de luz (Küpper *et al.*, 2006, tomado de Liu *et al.*, 2010) (Figura 2). La determinación de clorofila *a*, *b* y carotenos se basa en la absorción de los pigmentos en zonas específicas del espectro 400 a 700 nm, que corresponden a los picos máximos de absorción (Figura 3).

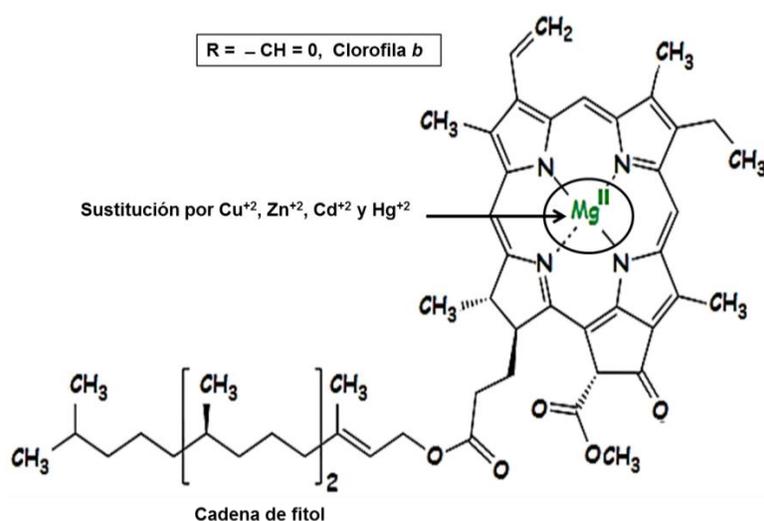


Figura 2. Sustitución de metales por el ion Mg^{+2} en la molécula de clorofila *a*

Con los bioensayos de fitotoxicidad se puede evaluar cualquier matriz ambiental (agua, aire, suelo y sedimento), así como abonos orgánicos, extractos de suelo, sedimento, abonos orgánicos, lixiviados y sustancias puras, además tiene la ventaja de que las semillas pueden almacenarse a temperatura ambiente y a la sombra, lo que ofrece un bajo costo de mantenimiento; entre las desventajas se encuentra que los efectos pueden ser estimuladores o inhibitorios, lo cual depende del tipo y concentración del contaminante al que se exponen, de factores ambientales como pH, temperatura y materia orgánica, así como de la especie vegetal (López *et al.*, 2009). La Tabla 1 ofrece una lista de plantas, contaminantes, ma-

triz ambiental y variables evaluadas de diferentes ensayos de fitotoxicidad.

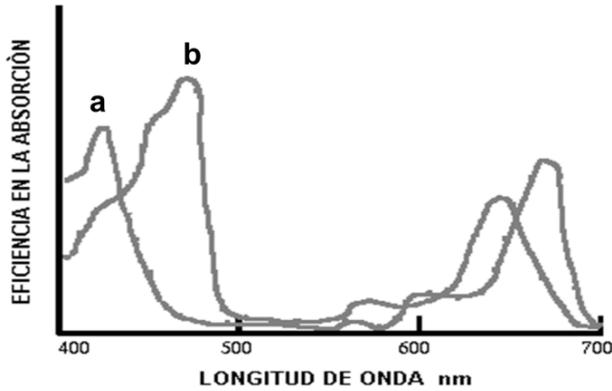


Figura 3. Eficiencia de absorción de la clorofila a y b

OBJETIVO

Proporcionar al estudiante los fundamentos prácticos de la prueba de fitotoxicidad en suelo/sedimento para determinar las variables de crecimiento, producción de biomasa seca y concentración de pigmentos fotosintéticos como indicadores de toxicidad.

EQUIPO

Balanza analítica	Espectrofotómetro UV Visible
Balanza granataria	Horno de secado
Centrifuga	Refrigerador

MATERIAL

Bisturí o tijera	Papel absorbente
Bolsas de papel	Picetas de 500 ml
Contenedores de plástico de 4 L	Pinzas
Charola de plástico	Pipeta de 10 ml
Espátula	Pipeta Pasteur
Frascos de vidrio de 250 ml	Regla o vernier
Guantes de látex	Semillas de haba (<i>Vicia faba</i>)
Hielo	Semillas de rábano (<i>Rhapanus sativus</i>)
Invernadero	Semillas de maíz (<i>Zea mays</i>)
Lámpara de luz tenue	Suelo o sedimento
Macetas de plástico de 250 g	Tubos de centrifuga de 15 ml
Mortero y pistilo	Vasos de precipitado de 500 ml

Tabla 1. Plantas que han sido empleadas para pruebas de fitotoxicidad

Planta	Matriz/Contaminante	Variable	Referencia
<i>Leucaena</i> sp. <i>Mimosa</i> sp. <i>Mimosa pigra</i>	Petróleo crudo e intemperizado	Altura de planta, biomasa seca, número de nódulos, presencia/ausencia de leghemoglobina	Rivera <i>et al.</i> (2005)
<i>Zea mays</i> <i>Lolium perenne</i>	Composta y sedimento	Altura de planta, biomasa seca, actividad de las enzimas PEPC y GS	Bedell <i>et al.</i> (2006)
<i>Lactuca sativa</i> <i>Sichorium endivia</i> var. <i>lisa</i> <i>Sichorium intybus</i> var. <i>finia</i> <i>Vicia faba</i>	Efluentes de la industria citrícola y de la caña de azúcar Agua contaminada con metilmercurio	Longitud de radícula e hipocótilo Índice de germinación	Navarro <i>et al.</i> (2006) Álvarez <i>et al.</i> (2006)
<i>Lactuca sativa</i> <i>Lycopersicum esculentum</i>	Efluente de industria textil	Longitud de radícula e hipocótilo	Segundo <i>et al.</i> (2009)
<i>Lactuca sativa</i>	Jales mineros	Longitud de radícula e hipocótilo, presencia/ausencia de necrosis en la radícula	Escoto <i>et al.</i> (2009)
<i>Lactuca sativa</i> <i>Raphanus sativus</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	Residuos de la producción bionérgica Sales de Cd, Zn y Cu	Longitud de radícula e hipocótilo Fluorescencia de clorofila <i>a</i>	Gell <i>et al.</i> (2011) Martínez <i>et al.</i> (2011)
<i>Salvinia natans</i>	Sales de Co, Zn, Mn, Cr, Fe, Ni, Cu, Pb y Cd	Concentración de pigmentos fotosintéticos, enzima rubisco	Dhir <i>et al.</i> (2011)
<i>Vicia faba</i>	Suelos contaminados con Cd	Longitud de raíz, número de nódulos, biomasa seca, concentración de pigmentos fotosintéticos	García <i>et al.</i> (2012)
<i>Lycopersicum esculentum</i> <i>Hordeum vulgare</i>	Suelos contaminados con Pb	Biomasa seca	Cheyns <i>et al.</i> (2012)
<i>Hordeum vulgare</i>	Jales mineros, suelos de serpentina (ricos en Ni, Cr y Co) y contaminados con Cu	Longitud de la radícula	Zhang <i>et al.</i> (2013)
<i>Betula populifolia</i> <i>Quercus prinus</i> , <i>Q. rubra</i> <i>Pinus strobus</i> <i>Hacer rubrum</i> <i>Glycine max</i>	Suelos contaminados con Zn	Longitud de la radícula	Beyer <i>et al.</i> (2013)
<i>Cucumis sativus</i> <i>Echinochloa cruz-galli</i>	Herbicidas preemergentes	Germinación, mortalidad, biomasa seca y concentración de pigmentos fotosintéticos	Mohamed <i>et al.</i> (2013)

PEPC, enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa; GS, enzima glutamina sintetasa; Rubisco, enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa oxigenasa. Fuente: Elaboración propia.

REACTIVOS

Nombre	Marca	No catálogo
Acetona (C ₃ H ₆ O)	SIGMA	A4206
Agua destilada	JT BAKER	4220-20
Solución de hipoclorito de sodio [6%] (NaClO)	CLORALEX	

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Acetona al 80%

Para preparar 100 ml, se mezclan 80 ml de acetona y 20 ml de agua destilada, se guarda en el refrigerador a 4 °C en frasco de vidrio color ámbar durante un periodo máximo de un mes.

Hipoclorito de sodio al 3%

Para preparar 100 ml, en un vaso de precipitado agregar 30 ml de hipoclorito de sodio y 70 ml de agua destilada, la mezcla se prepara al momento de utilizarla y se desecha una vez que se emplea.

METODOLOGÍA

Evaluación del porcentaje de germinación de semillas.

Para determinar si los lotes de semillas de haba, maíz y rábano (Figura 4) son de buena calidad se realiza una prueba de germinación por especie.



Figura 4. Semillas de haba, maíz y rábano

Sumergir 100 semillas en una solución de NaClO al 3% durante 15 min para desinfectarlas, enseguida se enjuagan tres veces con agua destilada, se colocan durante 15 min en un vaso de precipitado con agua destilada hasta cubrir las, con el fin de eliminar los residuos del hipoclorito. Posteriormente las semillas se colocan en una charola de plástico entre dos capas de papel absorbente húmedo y se introduce en una cámara de incubación a 20 ± 5 °C. Se realizan observaciones diarias y una vez que emerge la plántula se concluye la prueba (Figura 5).

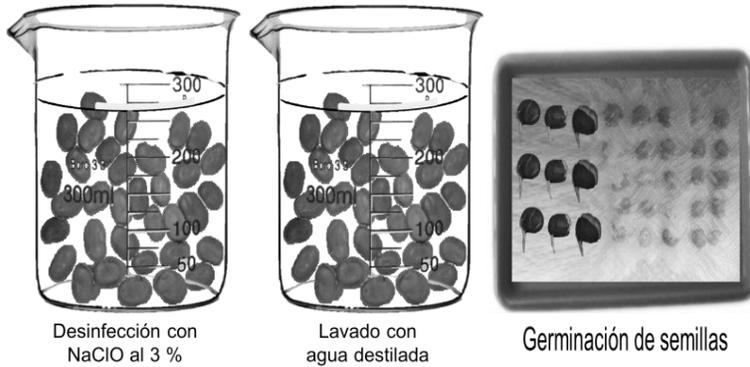


Figura 5. Germinación de semillas

Establecimiento de la prueba en invernadero

La prueba de fitotoxicidad evalúa la toxicidad del suelo y/o sedimento contaminado con respecto al testigo. Se pesan 250 g de cada suelo o sedimento, se coloca en macetas de plástico, previamente etiquetadas. En el testigo se utilizará suelo sin contaminar (previamente

se determina tipo de contaminante y concentración, así como propiedades fisicoquímicas). Los suelos y/o sedimentos se humedecen y se siembran 3 semillas (haba, maíz y/o rábano respectivamente). El experimento se establece en condiciones de invernadero, se riega a diario para mantener la humedad constante (Figura 6).



Figura 6. Establecimiento de la prueba bajo condiciones de invernadero

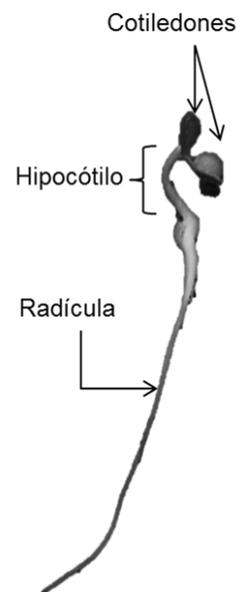
La duración de la prueba es de 10 a 15 días, finaliza cuando aparecen en rábano y haba los cotiledones y el coleóptilo en maíz (Figura 7). Las plántulas se observan diariamente, registrando cualquier cambio en ellas, como amarillamiento o necrosis, al final se determina el número de plántulas con/sin efectos como complemento del daño tóxico. Al finalizar la prueba se obtiene la producción de biomasa, longitud de la radícula e hipocótilo/coleóptilo y concentración de clorofila *a*, *b* y carotenos.

Longitud de la radícula e hipocótilo (rábano y haba), de raíces adventicias y coleóptilo (maíz).

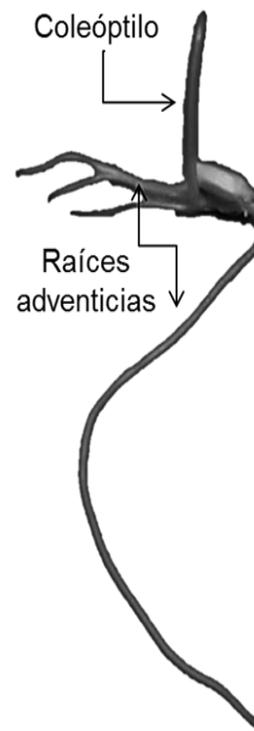
Extraer las plántulas de las macetas y separar la radícula del hipocótilo de rábano y haba y en maíz, separar las raíces adventicias del coleóptilo. Lavar con agua de grifo la radícula y raíces adventicias para eliminar el suelo adherido, colocar de manera horizontal sobre una superficie plana y llevar a cabo la medición con la ayuda de una regla en mm (Figura 8). Posteriormente medir la longitud del hipocótilo/coleóptilo de las plántulas.

Cuantificación de biomasa seca.

Las partes de las plántulas de rábano y haba (radícula e hipocótilo) y de maíz (coleóptilo y raíces adventicias) se colocan en bolsas de papel, se introducen en un horno a 70 °C por 48 h para eliminar humedad, posteriormente en una balanza analítica se pesa cada parte de la plántula. La biomasa seca es igual a la suma de los pesos individuales expresada en mg.



Rábano y Haba
Dicotiledónea



Maíz
Monocotiledónea

Figura 7. Cotiledones (rábano y haba) y coleóptilo (maíz)

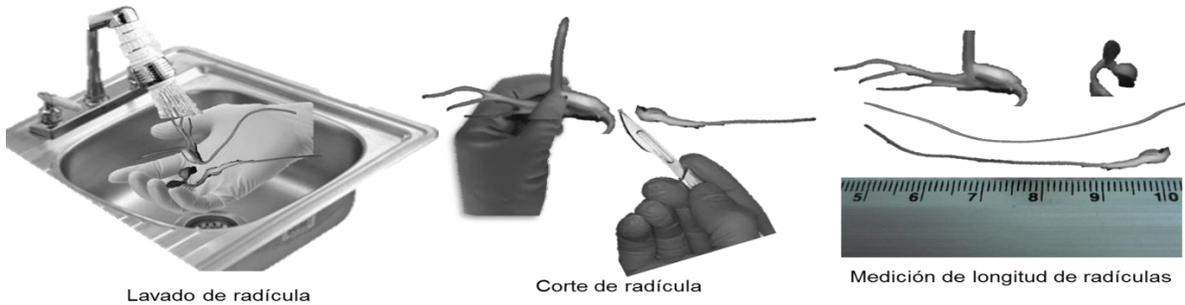


Figura 8. Longitud de radícula e hipocótilo en rábano y haba, raíces adventicias y coleótilo en maíz

Concentración de pigmentos fotosintéticos

En un cuarto con luz tenue se coloca una bandeja de plástico de 4 L con hielo, se acomoda un mortero con 5 ml de acetona al 80 %, en él se maceran 250 mg de tejido vegetal (cotiledones o coleótilos, según la especie), el homogenizado se transfiere a un tubo de centrifuga de 15 ml (previamente frío), el mortero se enjuaga con 5 ml de acetona y se recupera en el mismo tubo, se afora a 10 ml con acetona al 80 %. Centrifugar 2 min a 2000 rpm, el sobrenadante, el cual contiene

los pigmentos se vacía en una celda para su lectura en un espectrofotómetro UV-Visible. El equipo se calibra con un blanco de acetona al 80%, la lectura se realiza en absorbancia de 470, 646 y 663 nm (Figura 9).



Figura 9. Extracción de pigmentos fotosintéticos en plántulas

Para determinar la concentración de carotenos, clorofila *a* y *b*, cuando la extracción se realiza con acetona al 80 %, se emplean las ecuaciones propuestas por Wellburn (1994):

$$(Ec. I) \quad Cla = 12.21 (A663) - 2.81 (A646)$$

$$(Ec. II) \quad Clb = 20.13 (A646) - 5.03 (A663)$$

$$(Ec. III) \quad Carotenos = \frac{1000 (A470) - 3.27 (Cla) - 104 (Clb)}{198}$$

Donde:

Cla = Concentración de clorofila *a* expresada en µg/ml

Clb = Concentración de clorofila *b* expresada en µg/ml

12.21, 2.81, 20.13, 5.03, 1000, 3.27, 104 y 198 = Coeficientes de extinción específico (εs) expresados en términos de concentración (µg/ml) determinados por Lichtenthaler y Wellburn (1983).

A (470) = Lectura de absorbancia a 470 nm.

A (646) = Lectura de absorbancia a 646 nm.

A (663) = Lectura de absorbancia a 663 nm.

Para obtener la concentración de pigmentos fotosintéticos en mg/g de cotiledones o coleóptilo se deberá realizar la conversión con las siguientes ecuaciones:

$$(Ec. IV) \quad Cla = \frac{Cla \left(\frac{\mu g}{ml}\right) \times ml \text{ de acetona} \times 0.001}{g \text{ de tejido vegetal}}$$

$$(Ec. V) \quad Clb = \frac{Clb \left(\frac{\mu g}{ml}\right) \times ml \text{ de acetona} \times 0.001}{g \text{ de tejido vegetal}}$$

$$(Ec. VI) \quad Carotenos = \frac{Carotenos \left(\frac{\mu g}{ml}\right) \times ml \text{ de acetona} \times 0.001}{g \text{ de tejido vegetal}}$$

Índices de fitotoxicidad

El índice de fitotoxicidad representa la respuesta de la plántula o de la planta a la exposición a los contaminantes presentes en el suelo/sedimento.

Se expresa como el índice relativo de fitotoxicidad (IRF) y el índice absoluto de fitotoxicidad (IAF) (Rivera y Trujillo, 2004).

Índice relativo de fitotoxicidad (IRF)

Se calcula para cada especie vegetal (haba, rábano y maíz) y para cada variable.

Los IRF de cada una de las variables evaluadas en el testigo se tomarán como referencia para medir los efectos de los contaminantes (Tabla 2).

Variables:

1. Longitud de la radícula (rábano y haba).
2. Longitud del hipocótilo (rábano y haba).
3. Longitud de raíces adventicias (maíz).
4. Longitud del coleótilo (maíz).
5. La producción de biomasa seca.
6. La concentración de clorofila *a*.
7. La concentración de clorofila *b*.
8. La concentración de carotenos.

Para determinar el IRF se emplea la siguiente ecuación:

$$(Ec. VII) \quad IRF = \frac{A}{B}$$

Donde:

IRF = Índice relativo de fitotoxicidad

A = Variable de la plántula en el suelo/sedimento testigo

B = Variable de la plántula en el suelo/sedimento contaminado

Índice absoluto de fitotoxicidad (IAF)

Se determina para cada una de las plántulas (rábano, haba y maíz) mediante la suma de los IRF correspondientes (Tabla 2).

$$(Ec. VIII) \quad IAF = \sum IRF$$

Si los IRF e IAF son mayores representan un mayor efecto fitotóxico.

Si los IRF e IAF son menores el efecto fitotóxico es menor.

Si los IRF e IAF es igual a 0 indica que el suelo/sedimento no es tóxico.

Análisis estadístico de los datos

Los datos de cada una de las variables se analizan con un análisis estadístico de datos crudos, para determinar si existe una diferencia significativa entre el efecto inducido por los suelos/sedimentos problema con respecto al testigo.

Se realiza un análisis descriptivo, de varianza y una prueba de comparación de medias Dunnet, la cual compara cada uno de los suelos/sedimentos problema con el testigo.

Tabla 2. Índices de fitotoxicidad en rábano, haba y maíz

Variable	Rábano IRF	Haba IRF	Maíz IRF
Longitud de la radícula			
Longitud del hipocótilo			
Longitud de raíces adventicias			
Longitud del coleóptilo			
La producción de biomasa seca			
La concentración de clorofila <i>a</i> (mg/g)			
La concentración de clorofila <i>b</i> (mg/g)			
La concentración de carotenos (mg/g)			
Índice Absoluto de Fitotoxicidad (IAF)	Σ	Σ	Σ

LITERATURA CITADA

- Álvarez MMD, Mateos MJ, Peinado De DMV, Capó M. 2006. *Vicia faba* L.: capacidad bioindicadora de contaminación de agua por metilmercurio. *Revista Observatorio Medioambiental* 9:111-123.
- Baumgarten A, Spiegel H. 2004. Phytotoxicity (plant tolerance). Agency for Health and Food Safety, Vienna Austria. 36 p.
- Bedell JP, Briant A, Delolme C, Lassabatère L, Perrodin Y. 2006. Evaluation of the phytotoxicity of contaminated sediments deposited "on soil": II. Impact of water draining from deposits on the development and physiological status of neighbouring plants at growth stage. *Chemosphere* 62:1311-1323.
- Beyer WN, Green CE, Beyer M, Chaney RL. 2013. Phytotoxicity of zinc and manganese to seedlings grown in soil contaminated by zinc smelting. *Environ Pollution* 179:167-176.
- Cheyns K, Peeters S, Delcourt D, Smolders E. 2012. Lead phytotoxicity in soils and nutrient solutions is related lead induced phosphorus deficiency. *Environ Pollution* 164:242-247.
- Cuevas DMC, Roldán MA, Ferrera CR, Rodríguez VR. 2008. Ensayo de toxicidad aguda con *Eisenia andrei*. En: Ramírez R P, Mendoza C A. (compiladoras). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*. Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Méx.
- Dhir B, Sharmila P, Saradhi PP, Sharma S, Kumar R, Mehta D. 2011. Heavy metal induced physiological alterations in *Salvinia natans*. *Ecotoxicology Environ. Safety* 74:1678-1684.
- Escoto VM, Fernández GJ, Martín PF. 2007. Determination phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.) *Sci Total Environ.* 378:63-66.
- Evans GM, Furlong CJ. 2003. *Environmental biotechnology: Theory and application*. Wiley. 300 p.
- Fernández LLC, Rojas ANG, Roldán CTG, Ramírez IME, Zegarra MHG, Uribe HR, Reyes ARJ, Flores HD y Arce OJM. 2006. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Mexicano del Petróleo, SEMARNAT, INE, México, D.F. 184 p.
- García GE, García NE, Juárez SLF, Juárez SL, Montiel GJMR y Gómez CMA. 2012. La respuesta de haba (*Vicia faba*, L.) cultivada en un suelo contaminado con diferentes concentraciones de cadmio. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 28:119-126.
- García A, Dorado M, Pérez I, Cun R, López T, Montilla E. 2009. Acumulación de biomasa seca en diferentes órganos de la planta de arroz en condiciones de déficit hídrico. *Agronomía Trop.* 59(1):15-24.
- Gell K, van Groenigen J, Cayuela ML. 2011. Residues of bioenergy production chains as soil amendments: Immediate and temporal phytotoxicity. *Journal of Hazardous Materials* 186:2017-2025.
- Li X, Yang Y, Zhang J, Jia L, Li Q, Zhang T, Qiao K, Ma S. 2012. Zinc induced phytotoxicity mechanism involved in root growth of *Triticum aestivum* L. *Ecotoxicol Environ Saf* 86:198-203.
- Liu M, Liu X, Liu M, Fang M, Chi W. 2010. Neutralnetwork model for estimating leaf chlorophyll concentration in rice under stress from heavy metals using four spectral indices. *Biosystems Engineering* 106:223-233.
- López LJ, González CHMC, Esparza GFJ, Rodríguez VR. 2009. Toxicity assessment of soil amended with tannery sludge, trivalent chromium and hexavalent chromium using wheat, oat and sorghum plants. *Journal of Hazardous Materials* 163:829-834.
- Martínez PA, Reigosa JM, Sánchez MAM. 2011. Imaging chlorophyll a fluorescence reveals specific spatial distribution under different stress conditions. *Flora* 206:836-844.
- Mohamed F, El-Nady, Elsayed BB. 2013. Effect of phytotoxicity of pendimethalin residues and its bioremediation on growth and anatomical characteristics of *Cucumis sativus* and *Echinochloa crusgalli* plants. *Asian J Crop Sci.* 5:222-237.
- Navarro AR, Arrueta RG, Maldonado MC. 2006. Determinación de efecto de diferentes compuestos a través de ensayos de fitotoxicidad usando semillas de lechuga, escarola y achicoria. *Revista de Toxicología* 23:125-9.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2006. *Terrestrial plants test: seedling emergence and seedling growth test. Guideline for testing of chemicals*. No. 208. París, Fr. 21 p.

- Rivera CMC, Trujillo NA. 2004. Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. *Interciencia* 29: 369-376.
- Rivera CMC, Trujillo NA, Miranda CMA, Maldonado CE. 2005. Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleos nuevos e intemperizado mediante ensayos con leguminosas. *Interciencia* 30:326-331.
- Segundo TE, Soto MES, Juárez SLF, García NE, García GE. 2009. Efecto del agua residual de la industria textil en el crecimiento radicular de *Lactuca sativa* y *Licopersicum esculentum*. Memorias de resúmenes del 8º Congreso Internacional, 14º Nacional de Ciencias Ambientales y 3º Congreso de Medio Ambiente. Tlaxcala. 1 a 5 de Junio de 2009. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 25 (suplemento 1).
- Uribe R. 2008. Ensayo de inhibición de la germinación y del alargamiento radicular en semillas de cebolla *Allium cepa* y soya *Glycine max*. En: Ramírez R P., Mendoza C A. (compiladoras). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México.
- Visioli G, Menta C, Gardi C, Conti DF. 2013. Metal toxicity and biodiversity in serpentine soils: Application of bioassay tests and microarthropod index. *Chemosphere* 90:1267-1273.
- Weaver RW, Frederick LR. 1982. *Rhizobium*. En: Page AL (Ed) *Methods of soil microbiological properties agronomy monograph No.9* 2ª ed. ASA-SSSA Madison, WI, USA. 1043-1069 p.
- Wellburn RA. 1994. Spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144:307-313.
- Zhang X, Wang X, Wei D, Li B, Ma Y, Huang Z. 2013. The influence of soil solution properties on phytotoxicity of soil soluble copper in a wide range of soils. *Geoderma* 211-212:1-7.

VICIA FABA COMO BIOINDICADOR EN ECOGENOTOXICOLOGÍA

INTRODUCCIÓN

El DNA (Figura 1), es una molécula polimérica de alto peso molecular, es dinámica, cambia lenta pero continuamente generando una gran variedad de formas y características en los seres vivos, es portadora de la información genética desafortunadamente todos sus componentes básicos (bases nitrogenadas, azúcares y grupos fosfodiésteres) son posibles blancos de alteraciones químicas inducidas por agentes genotóxicos.

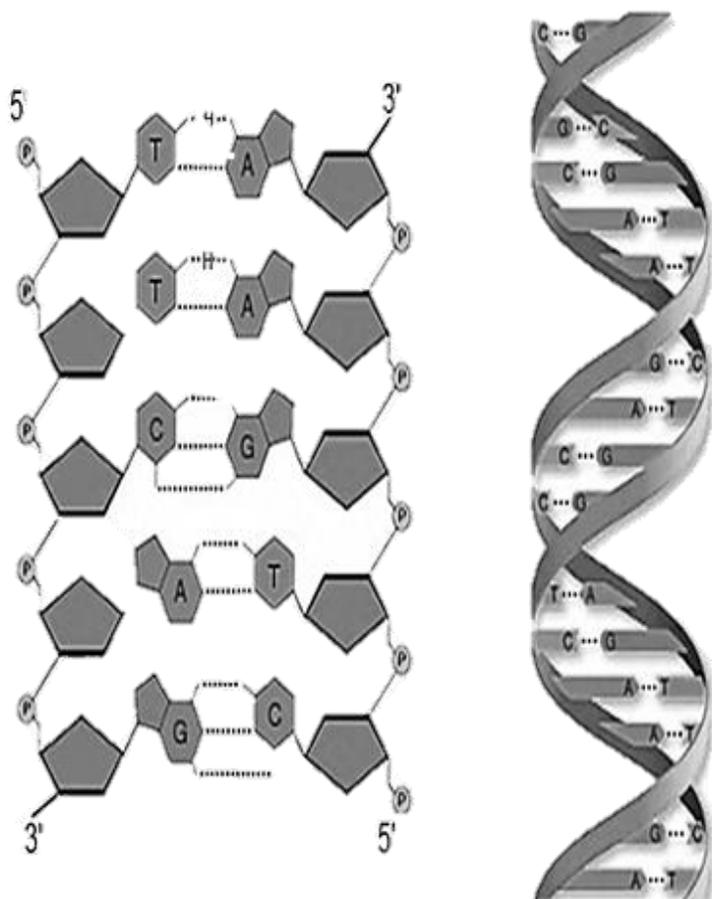


Figura 1. Molécula de DNA

Juárez-Santacruz L. 2013. *Vicia faba* como bioindicador en ecogenotoxicología. En: *Evaluaciones ecotoxicológicas* (García-Nieto *et al.*) Universidad Autónoma de Tlaxcala, México. p. 83-99.

La electroforesis de células individuales o ensayo cometa, cuantifica el daño en el DNA por acción de cualquier agente físico, químico o biológico, puede ser aplicado a *cualquier célula* y permite el análisis del daño genético al nivel de células individuales. Se utiliza como rutina en diferentes partes del mundo para el monitoreo ambiental y análisis de sensibilidad a compuestos genotóxicos.

El principio básico de esta técnica consiste en embeber células en geles de agarosa en un portaobjetos, someterlas a lisis alcalina o neutra con detergentes y sales, y a una corriente eléctrica durante un corto tiempo bajo condiciones alcalinas ($\text{pH} > 13$) o cercanas a la neutralidad ($\text{pH}=8.4$). El daño es representado por un aumento de fragmentos de DNA que migran fuera del núcleo bajo la apariencia de un cometa, con una cabeza (región nuclear con DNA no fragmentado) y una cola (formada por fragmentos de DNA nuclear que migran en dirección del ánodo). El tamaño, la forma y distribución del DNA en el cometa están relacionados con el número de rupturas que se han producido (Moller, 2005; Speit y Hartmann, 2005; Olive y Banath, 2006; Jiang *et al.*, 2007).

El mecanismo por el cual se forman los cometas es un aspecto que después de muchos años aún no se ha podido dilucidar completamente, desde las dos primeras versiones del ensayo descritas por Ostling y Johanson (1984) y Sing *et al.* (1998) se ha intentado establecer la naturaleza de la cola del cometa. Al

respecto Klaude *et al.* (1996) mencionan que la cola del cometa, bajo condiciones neutras, corresponde a lazos relajados, mientras que bajo condiciones alcalinas consiste en fragmentos de DNA. Otra propuesta la hacen Singh y Stephens (1997) describiendo que durante una electroforesis neutra, las moléculas individuales de DNA están ancladas a la matriz nuclear por un extremo, mientras que el otro migra fuera del núcleo por acción de un campo eléctrico, es decir, es como si cada hebra perteneciente a un cromosoma estuviese fuertemente unida a proteínas cada cierto intervalo, incluso después de la electroforesis.

Shaposhnikov *et al.* (2008) utilizaron la hibri-

dación *in situ* fluorescente mediante sondas genómicas con el fin de estudiar si la formación de la cola del cometa se explica simplemente por la relajación de lazos de DNA superenrollados. Ellos concluyeron que después de la electroforesis en condiciones neutras, donde el DNA de la cabeza así como el de la cauda no está desnaturalizado, la fluorescencia de la secuencia de la sonda se dispone linealmente a lo largo de la cola desde un punto fijo de la matriz nuclear. Sin embargo, después de la electroforesis alcalina, la apariencia de la fluorescencia emitida por la sonda se muestra de manera aglomerada, lo que induce a pensar en una interpretación fragmentada de la cola, o bien, que el DNA lineal se ha conglomerado presentándose en forma de gránulos.

Las ventajas que ofrece el ensayo cometa son: a) alta sensibilidad para detectar niveles bajos de daño al DNA; b) los datos son recolectados a nivel de células individuales en un periodo relativamente corto, dando información de la distribución intercelular del daño y de la reparación del DNA; c) se requiere sólo un número pequeño de células; d) virtualmente cualquier población de células eucariontes puede ser utilizada y e) es aplicable a diferentes estudios de biomonitorio (Collins *et al.*, 2008). La metodología del ensayo cometa se ha modificado, en etapas como la lisis y en los tiempo de electroforesis, con el propósito de adecuarlo para la evaluación de diversos tipos de daño en diferentes células (Collins, 2004; Speit y Hartmann, 2005).

Entre las limitantes del ensayo cometa se encuentra que los efectos mutagénicos por daño al DNA son difíciles de detectar debido a posibles mecanismos indirectos y de carcinogenicidad (efectos en el control del ciclo celular), otra desventaja del ensayo consiste en que se obtienen datos unicelulares (los cuales pueden ser hasta cierto punto limitantes), la pequeña cantidad de células en la muestra (que arroja un panorama parcial), la variabilidad técnica y la interpretación de los resultados. Sin embargo, las ventajas superan a las desventajas, por lo que el ensayo cometa sigue utilizándose en una gran variedad de campos que van desde la epidemiología molecular hasta la toxicología genética (Dhawan *et al.*, 2009).

La aplicación de la electroforesis en gel de células individuales o ensayo cometa ha revolucionado el campo de la ecotoxicología genética o ecogenotoxicología. Es un método que brinda la oportunidad de estudiar el daño al DNA, la reparación y muerte celular (apoptosis) en diferentes tipos celulares sin necesidad de un conocimiento previo del cariotipo y de la tasa de renovación celular (Jha, 2008), se utiliza además para detectar el daño *in vitro* o *in vivo* causado por una gran variedad de agentes genotóxicos (Xiao *et al.*, 2006; Kumaravel *et al.*, 2009).

Se realiza en condiciones neutras, aunque solo detecta rupturas de doble cadena, o bajo condiciones de lisis y electroforesis alcalina (pH>13), ésta permite analizar la migración del DNA debido a rupturas de cadena simple y doble (Figura 2) y sitios álcali lábiles (Collins *et al.*, 2008), lo cual resultó de gran utilidad ya que la mayoría de los agentes genotóxicos originan en mayor proporción éste tipo de daño.

Mediante la aplicación del ensayo cometa se puede

detectar además daño oxidativo en bases púricas o pirimídicas, entrecruzamientos DNA-DNA, DNA-proteína y DNA-xenobiótico, así como reparación del DNA en prácticamente cualquier célula eucarionte.

Durante más de 60 años se han utilizado plantas para bioensayos entre las que destacan *Allium cepa*, *Tradescantia pallidosa* *Nicotina tabacum* y *Vicia faba*, para estudiar el efecto de radiaciones ionizantes y no ionizantes y más tarde el efecto de mutágenos ambientales.

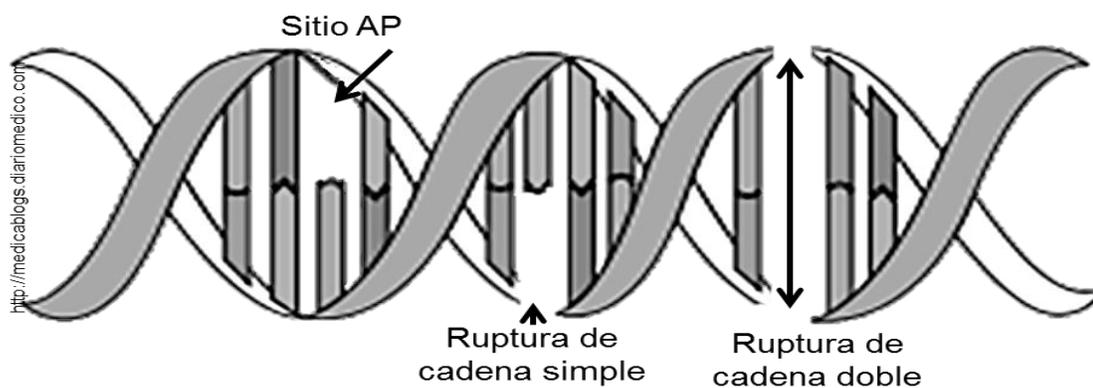


Figura 2. Tipos de daño al DNA generados por contaminantes ambientales

Las plantas superiores pueden ser utilizadas como un sistema alternativo en ensayos de primer nivel para la detección de posible daño genético, ya sea por agua o efluentes contaminados, actividad industrial, escorrentías agrícolas o contaminación atmosférica (Gichner *et al.*, 2007; Kumaravel *et al.*, 2009).

Los bioensayos con plantas se han integrado como un componente de genotoxicidad en la evaluación de riesgo y pueden ser usados para monitorear la presencia de mutágenos químicos y físicos de hábitats contaminados (Maluszynska y Juchimiuk, 2005; Patlolla *et al.*, 2012; Ventura *et al.*, 2013). Además los sistemas con plantas pueden proporcionar información sobre una amplia gama de daño genético, incluyendo mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas (Patlolla *et al.*, 2012; Juárez-Santacruz *et al.*, 2013).

Durante la última década, el ensayo cometa se ha utilizado en investigaciones ecotoxicológicas con plantas (hojas, brotes y raíces) para detectar el daño que al DNA se genera por diversos contaminantes (Dhawan *et al.*, 2009).

Con el ensayo cometa se ha estudiado la integridad del DNA de las plantas por efecto de la edad, así como la cinética de reparación en núcleos aislados de las hojas (Gichner *et al.*, 2000), mediante la aplicación de éste ensayo se evaluó el efecto de suelos contaminados con metales pesados, donde además

del daño al DNA se identificaron alteraciones en el crecimiento y morfología de la planta (hojas distorsionadas), que puede ser asociado con fragmentación del DNA por daño necrótico o apoptótico (Gichner *et al.*, 2006).

Un inconveniente de los modelos en plantas, ha sido el hecho de que la exposición necesita darse en el suelo y es difícil mencionar si los resultados demuestran sinergia con otros compuestos presentes en él, o si la disponibilidad de los tóxicos se debe a su afinidad a las partículas, una forma de descartar dicha sinergia es realizar la extracción de los posibles contaminantes del suelo y evaluar su genotoxicidad (Dhawan *et al.*, 2009; Juárez-Santacruz, 2012).

El ensayo cometa mide la aparición de rupturas del DNA, la preparación de muestras para realizar el análisis es un paso crucial, debido a que debe realizarse rápidamente y con precisión, para evitar perder el perfil del DNA dañado.

En las plantas, el aislamiento de los núcleos para incorporarlos en la agarosa es difícil, debido a que los tejidos contienen membranas celulares gruesas como la pared celular. Para liberar a los núcleos se requiere de una extracción mecánica (Figura 3) mediante cortes del tejido vegetal con una navaja bien afilada y en frío (4 °C), esto además de liberar rápidamente a los núcleos no requiere dar procesamientos adicionales, como en las células animales, que requieren ser tratadas con soluciones hipertónica y detergentes no iónicos para disolver la membrana y eliminar restos

celulares (Koppen y Verschaeve, 1996; Juárez-Santacruz, 2012; Ventura *et al.*, 2013).

Entre los sistemas vegetales para evaluar el daño citogenético está el de las células meristemáticas de la raíz de *V. faba* debido a su fácil manejo, y a que tiene pocos cromosomas, además ha demostrado ser versátil y eficiente (Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1995).

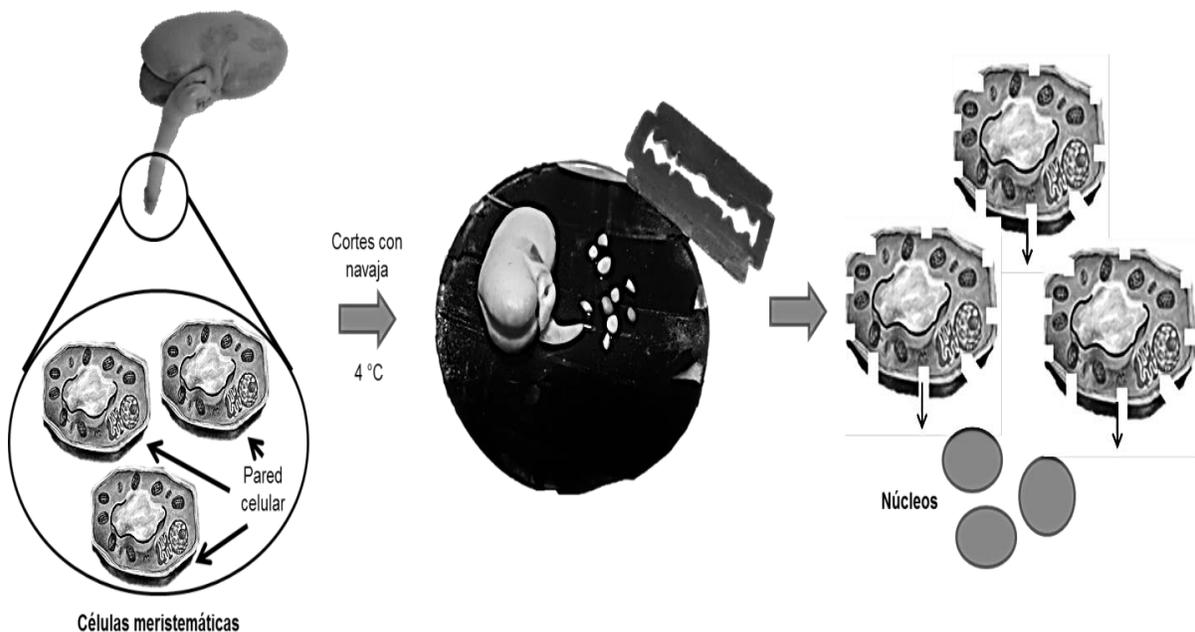


Figura 3. Extracción mecánica de núcleos de células meristemáticas de *V. faba*

Por otra parte, el ensayo cometa en estas células se ha utilizado para evaluar el daño al DNA generado por contaminantes ambientales como plomo (Pourrut *et al.*, 2011) y por suelos contaminados por compuestos orgánicos persistentes, entre otros (Juárez-Santacruz, 2012).

Se ha reportado que el procedimiento de electroforesis alcalina es más sensible a dosis bajas, mientras que el procedimiento en la electroforesis neutral ha mostrado curvas óptimas de dosis-respuesta dentro de un amplio intervalo de concentraciones (Lin *et al.*, 2007), además el ensayo cometa es útil para detectar un fenómeno semejante a la adaptación clastogénica a nivel molecular (Angellis *et al.*, 2000).

Las aplicaciones del ensayo cometa en plantas son todavía limitadas, comparadas con el uso en sistemas animales, sin embargo, la técnica se perfila como una herramienta útil para determinar el potencial de las plantas superiores como sensores estables en los ecosistemas y como fuente de información sobre los efectos genotóxicos de contaminantes peligrosos (Ventura *et al.*, 2013). El uso de éste ensayo para evaluar el efecto de contaminantes ambientales es relevante, pero se sugiere complementarlo con otros parámetros ecotoxicológicos que incluyan organismos de diferentes niveles tróficos, daño desde el nivel molecular cromosómico, etc., hasta de comunidades y ecosistema. Es importante también integrar aspectos químicos y fisiológicos que permitan prede-

cir la biodisponibilidad y toxicidad de los contaminantes presentes en las matrices ambientales, debido a que la información obtenida a través de estudios integrados con aplicaciones de múltiples biomarcadores en diferentes organismos silvestres y/o cultivados en laboratorio podría proporcionar una dimensión holística del impacto toxicológico de mutágenos ambientales, con el fin coadyuvar a la protección de la salud humana y la supervivencia de las diferentes especies (Jha, 2008).

OBJETIVO

Explicar la metodología del ensayo cometa en células vegetales, para la evaluación de la genotoxicidad de contaminantes presentes en matrices ambientales (suelo y/o sedimento).

EQUIPO

Agitador tipo Vórtex
Balanza analítica y granataria
Cámara de electroforesis horizontal con fuente de poder
Campana de extracción de humos
Contador de células
Estufa de cultivo
Horno de microondas
Microscopio de epifluorescencia con lámpara de mercurio y fuente de poder
Placa de agitación con calentamiento
Potenciómetro
Refrigerador

MATERIAL

Agitadores magnéticos	Lámpara de luz amarilla
Algodón	Matraz volumétrico de 10, 100 y 1000 ml
Bandeja de plástico	Matraz Erlenmeyer de 50 ml
Bisturí	Micropipeta de 5, 20 y 100 μ l
Bulbos de plástico para pipeta	Navajas para afeitar
Coplin de plástico opaco	Papel filtro
Coplin de vidrio	Papel absorbente
Cajas porta laminillas	Pipetas Pasteur
Cristalizadores 80 x 40 mm	Pinzas
Cristalizadores 190 x 100 mm	Portaobjetos esmerilado de 26 x 76 mm
Charola de plástico	Placas de metal de 15 x 15 cm
Charola de vidrio (tipo refractario)	Probeta de 100 ml
Cubreobjetos 24 x 50 mm	Puntas para micropipeta
Gradillas para tubos de 2 ml	Rejillas de metal de 30 x 20 cm
Espátula	Tubos Eppendorf de 2 ml
Hielo	Vasos de precipitado de (100 y 250 ml)
Frascos de vidrio de 100, 250 y 500 ml	Vidrios de reloj de 80 mm de diámetro

REACTIVOS

Nombre	Marca	No. de catalogo
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	SIGMA	E-5134
Agarosa de bajo punto de fusión (ABPF)	SIGMA	A-9414
Agarosa regular (AR)	SIGMA	A-9918
Bromuro de etidio (BE)	SIGMA	E-8751
Cloruro de potasio (KCl)	JT BAKER	3040-01
Cloruro de sodio (NaCl)	JT BAKER	3624-01
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	JT BAKER	3246-01
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	JT BAKER	3828-01
Hidróxido de sodio (NaOH)	JT BAKER	3722-01
Metanol (CH ₃ OH)	JT BAKER	9070-07
Tris-HCl	RESEARCH ORGA-NICS	9682T

PREPARACIÓN DE REACTIVOS**Agarosa regular (AR) al 0.5 %**

Para preparar 10 ml se pesan 0.05 g de AR, se colocan en un matraz Erlenmeyer de 50 ml y se añaden 10 ml de agua desionizada, se calienta en un horno de microondas 10 s, 2 ó 3 veces hasta completar la disolución, preparar el día de su uso, no almacenar.

Agarosa de bajo punto de fusión al 0.5 %

En un matraz Erlenmeyer colocar 0.05 g de ABPF, agregar 10 ml de agua desionizada y calentar 2 ó 3 veces por 10 s en un horno de microondas, hasta que se disuelva. Preparar el día de su uso, no almacenar.

Bromuro de etidio al 0.02 %

Colocar en un matraz volumétrico de 50 ml 0.01 g de bromuro de etidio y aforar con agua desionizada.

Guardar en frasco ámbar y cubrir con papel aluminio. Utilizar guantes de nitrilo, porque el BE es cancerígeno.

Amortiguador de neutralización pH 7.5

Para preparar 500 ml se pesan 3.15 g de Tris-HCl (0.4 M), se mezclan con 400 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7.5 y se afora a 500 ml. Guardar en frasco ámbar a temperatura ambiente hasta por un mes.

Amortiguador fosfato salino (PBS)

Para preparar 100 ml de amortiguador se requieren los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración (mM)	Cantidad (g)
NaCl	137 mM	0.800 g
Na ₂ HPO ₄	10 mM	0.144 g
KCl	2.7 mM	0.020 g
KH ₂ PO ₄	2 mM	0.024 g

Disolver todos los reactivos en 80 ml de agua desionizada, cuando se complete la disolución se ajusta el pH a 7.4 con HCl, posteriormente se afora a 100 ml. Guardar en frasco de vidrio color ámbar a temperatura de 4 °C por un máximo de dos meses.

Amortiguador de electroforesis

Solución madre de NaOH 10 N

Para preparar 250 ml, se pesan 100 g de NaOH y se disuelven en agua destilada, dejar enfriar a temperatura ambiente y completar el aforo a 250 ml, guardar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

Solución madre de EDTA 200 mM

Para preparar 100 ml se pesan 7.44 g de EDTA y se disuelven poco a poco con agua destilada, para completar la disolución, puede agregar 3 ó 4 hojuelas de NaOH, ajustar el pH a 10 con HCl, aforar a 100 ml, guardar en frasco color ámbar a temperatura ambiente. La solución amortiguadora se prepara una hora antes de su uso y se coloca en el refrigerador para

enfriar a 4 °C. Para preparar 1 L a una concentración final de NaOH de 300 mM y 1 mM de EDTA, se mezclan 30 ml de la solución madre de NaOH y 5 ml de la solución madre de EDTA, se afora a 1000 ml, y se ajusta el pH a 13 con NaOH o HCl. No almacenar.

METODOLOGÍA

Preparación y germinación de semillas

Aproximadamente 50 semillas de haba (*V. faba*) se lavan con agua corriente frotándolas vigorosamente, posteriormente se colocan en un cristizador con agua destilada durante 24 h para su imbibición, transcurrido el tiempo se colocan entre dos capas de algodón húmedo para su germinación, se mantienen a temperatura constante (20 °C) y

en la oscuridad aproximadamente 3 días (Figura 4). Al aparecer la radícula, se elimina la testa y al medir la raíz principal de 2 a 3 cm, se elimina la cofia (Figura 5).



Figura 4. Proceso de germinación de semillas de *V. faba*

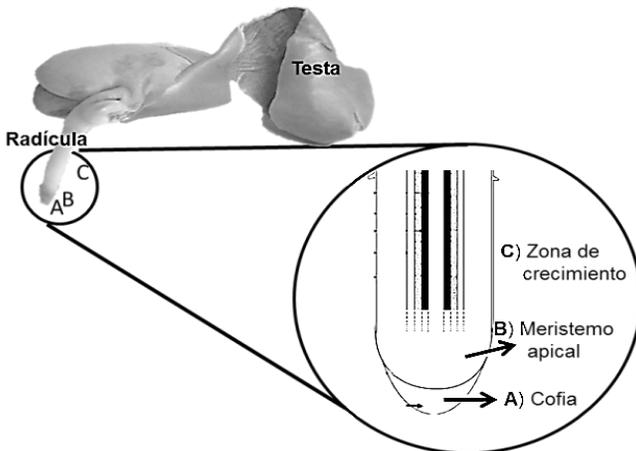


Figura 5. Componentes de una semilla de *V. faba* germinada

Exposición de raíces de *V. faba*

La exposición de las raíces se realiza en cristalizadores de vidrio, en ellos se colocan 50 g de suelo y/o sedimento humedecidos con 50 ml de agua destilada, 10 raíces de *V. faba* se exponen, cuidando que los meristemos queden en contacto con la muestra (Fi-

gura 6), el tiempo de exposición es de 4 h, según lo recomendado para los protocolos de los ensayos citogenéticos (Koppen y Verschaeve, 1996; Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1995). Al mismo tiempo se coloca un testigo negativo (suelo libre de contaminantes o agua desionizada) en las mismas condiciones que el suelo problema.



Figura 6. Exposición de raíces de *V. faba*

Preparación de laminillas

En portaobjetos previamente lavados con metanol y secados con gasa se colocan 165 μ l de AR y se extiende en to-

da la superficie con el dedo índice libre de grasa, se dejan solidificar a temperatura ambiente o sobre una placa de calentamiento a 50 °C, una vez secas se guardan hasta su uso en cajas para laminillas y en lugar fresco (Figura 7).

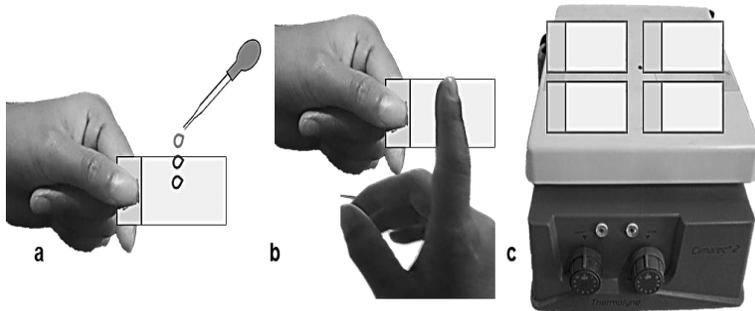


Figura 7. Preparación de laminillas con AR.
a) 75 µl de AR, b) Extendido, c) secado de laminillas

Aislamiento de núcleos

Transcurrido el tiempo de exposición las raíces de *V. faba* se enjuagan con agua desionizada y se procede al aislamiento de los núcleos. En una bandeja con hielo se coloca un vidrio de reloj al cual se le agregan 400 µl de amortiguador fosfato salino frío (4 °C), en él, los meristemos de cada una de las raíces de *V. faba* se rebanan suavemente con una navaja de afeitar (Navarrete *et al.*, 1997; Menke *et al.*, 2000), esta suspensión nuclear se transfiere a un tubo Eppendorf (Figura 8).

Preparación de núcleos sobre las laminillas

En un tubo Eppendorf se colocan 100 µl de la suspensión nuclear y se mezclan con una cantidad igual de ABPF, 75 µl de la mezcla se colocan en un portaobjeto previamente preparados con AR, se le coloca

un cubreobjetos y se dejan solidificar a 4 °C durante 5 min, pasado el tiempo se retira el cubreobjetos y se agrega 75 µl de ABPF para cubrir la capa celular, nuevamente se le coloca el cubreobjetos y se deja solidificar por 5 min a 4 °C, se realizan dos laminillas por tratamiento (Figura 9).



Figura 8. Aislamiento de núcleos de células meristemáticas de *V. faba*

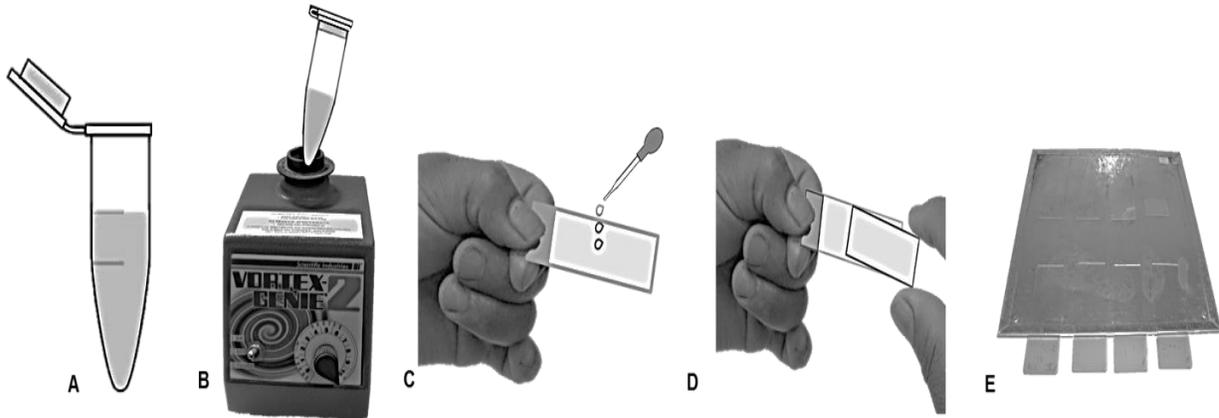


Figura 9. Preparación de núcleos sobre agarosa. A) Suspensión nuclear más AR; B) Agitación 5 seg; C) Suspensión nuclear en portaobjetos; D) Cubrir con portaobjetos E) Solidificación en frío (4 °C)

Desenrollamiento y electroforesis

En un cuarto oscuro se acomoda la cámara de electroforesis sobre una charola de vidrio con hielo alrededor para mantener el sistema a 4 °C. Transcurrido el tiempo de solidificación de la segunda capa de agarosa se retira el cubreobjetos y las laminillas se colocan de forma horizontal en la cámara de electroforesis, se agrega amortiguador de electroforesis (pH alcalino) recién elaborado y previamente enfriado a 4 °C hasta que las laminillas queden cubiertas, se de-

jan de esta forma durante 10 min con el fin de permitir el desenrollamiento del DNA. Posteriormente se aplica una corriente eléctrica de 12 V y 230 mA durante 10 min para permitir la migración de los fragmentos de DNA (Figura 10).



Figura 10. Sistema para desenrollamiento de molécula de ADN y electroforesis

Las laminillas se retiran de la cámara y se limpian por la parte posterior para eliminar el exceso de sales, se acomodan sobre una rejilla de metal y se neutralizan mediante tres lavados durante 5 min cada vez con amortiguador de neutralización, seguido de dos enjuagues con agua desionizada (Figura 11)

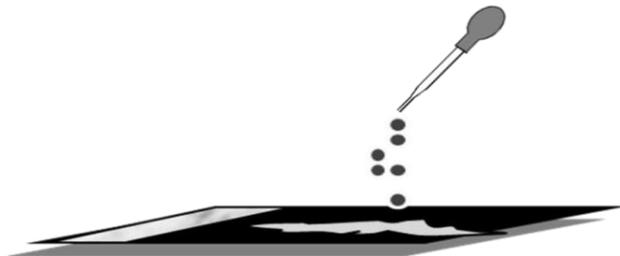


Figura 11. Neutralización y lavado de laminillas

Finalmente se colocan en un Coplin con metanol por 5 min, una vez transcurrido el tiempo se dejan secar y se guardan hasta su análisis al microscopio (Figura 12).

Análisis microscópico

Las laminillas se tiñen con 30 μ l de bromuro de etidio al 0.02 % (Figura 13). Se analizan en un microscopio de epifluorescencia (Figura 14) a un aumento de 40X. Se analizan 100 moléculas de DNA por duplicado, las cuales se clasifican visualmente en 4 categorías o clases de daño según la longitud de la cauda (Figura 15) (Collins, 2004; Kumaravel *et al.*, 2009; García *et al.*, 2011).

- a) Clase 0: DNA no fragmentado.
- b) Clase 1: La longitud de la cauda es menor al diámetro de la cabeza.

- c) Clase 2: La longitud de la cauda está entre una y dos veces el diámetro de la cabeza.
- d) Clase 3: La longitud de la cauda es mayor al doble del diámetro de la cabeza.



Figura 12. Lavado de laminillas con metanol

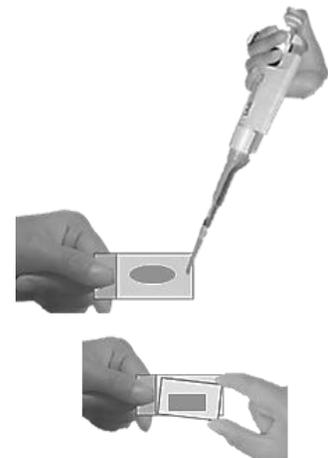


Figura 13. Tinción con BE



Figura 14. Análisis de cometas en microscopio de epifluorescencia

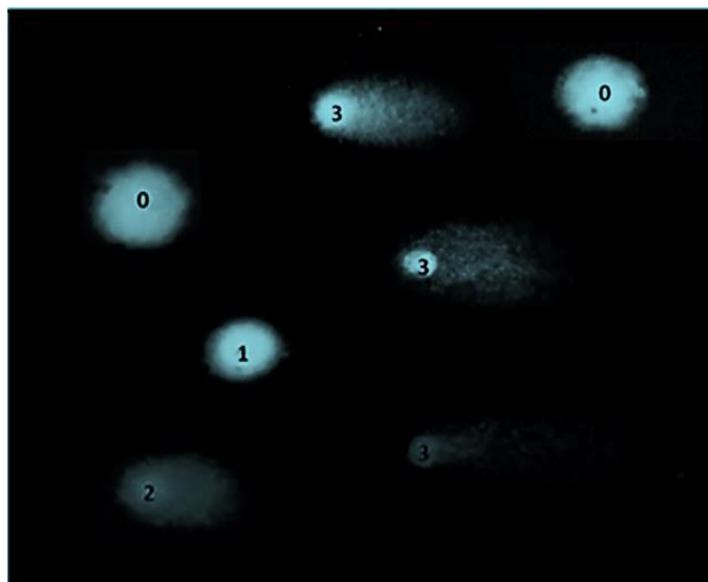


Figura 15. Moléculas de DNA con diferentes clases de daño

Cálculos

Se obtiene el índice de daño del ensayo cometa (DICA) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$(Ec. 1) DICA = (n_0 \times 0) + (n_1 \times 1) + (n_2 \times 2) + (n_3 \times 3)$$

Donde:

n = número de moléculas de DNA en cada clase.

0 a 3 = número de cada clase.

El DICA total de las 100 células se obtiene en un intervalo de 0 a 300 unidades arbitrarias (ua) (Tabla 1).

Análisis estadístico

Se realiza un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de contraste de Dunnett con una significancia de $p < 0.05$, para la comparación de los grupos expuestos con el testigo negativo. Se utiliza el paquete estadístico SIGMA PLOT versión 14.0.

Tabla 1. Ejemplo de obtención del DICA

Suelo	No. de moléculas de DNA	Clase				DICA
		0	1	2	3	
ST1	100	44	40	13	3	75
ST2	100	12	38	40	10	148
TES neg	100	82	12	4	2	26

LITERATURA CITADA

- Angellis KJ, McGuffie M, Menke M, Schubert I. 2000. Adaptation to alkylation damage in DNA measured by the comet assay. *Environ Mol Mutagen.* 36: 146-150.
- Collins AR. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Molec Biotech.* 26:249-261.
- Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Stetina R. 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23(3):143-151.
- Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D. 2009. Comet assay: a reliable tool for assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol.* 25:5-32.
- García O, Romero I, González JE, Moreno DL, Cuétara E, Rivero Y, Gutiérrez A, Pérez CL, Álvarez A, Carnesolta D, Guevara I. 2011. Visual estimation of the percentage of DNA in the tail in the comet assay: Evaluation of different approaches in an intercomparison exercise. *Mutat Res.* 720: 14-21.
- Gichner T, Menke M, Stavreva DA, Schubert I. 2000. Maleic hydrazide induces genotoxic effects but no damage detectable by the comet assay in tobacco and field beans. *Mutagenesis.* 15:385-389.
- Gichner T, Patková Z, Száková J, Demnerová K. 2006. Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65(3):420-426.
- Gichner T, Lovecká P, Kochánková L, Macková M, Demnerová K. 2007. Monitoring toxicity, DNA damage, and somatic mutations in tobacco plants growing in soil heavily polluted with polychlorinated biphenyls. *Mutat Res.* 629:1-6.
- Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R. 1995. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in *Vicia faba* as genetic monitors of environmental pollutants. *En: Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change.* Eds by F.M. Butterworth *et al.*, N Y. 95-113.
- Jha AN. 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis.* 23(3):207-221.
- Jiang L, Wang Y, Li S. 2007. Application of the Comet assay to measure DNA damage induced by UV radiation in the hydrophyte, *Spirodela polyrhiza*. *Physiol. Plant* 129:652-657.
- Juárez-Santacruz L. 2012. Evaluación de la genotoxicidad de plaguicidas organoclorados presentes en suelos agrícolas de Tlaxcala, México. Tesis de Doc UAEH p 132.
- Juárez-Santacruz L, García-Nieto E, Costilla-Salazar R, García-Gallegos E, Coronel-Olivares C, Gómez-Camarillo M, Gaytán-Oyarzún JC. 2013. Assessment of the genotoxic potential of sediments contaminated with pops and agricultural soils using *Vicia faba* micronucleus assay. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 22(3):288-300.
- Klaude. M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G. 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res.* 363:89-96.
- Koppen G, Verschaevé L. 1996. The alkaline comet test on plant cells: A new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba*. *Mutat Res.* 360:193-200.
- Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP, Jha AN. 2009. Comet assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol.* 25:53-64.
- Lin A, Zhang X, Chen C, Cao Q. 2007. Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *J. Environ. Sci.* 19:596-602.
- Maluszynska J. y Juchimiuk J. 2005. Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. *Plant genotoxicity. Arh Hig Rada Tok-sikol.* 56:177-184.
- Menke M, Meister A, Schubert I. 2000. *N*-Methyl-*N*-nitrosourea-induced DNA damage detected by the comet assay in *Vicia faba* nuclei during all interphase stages is not restricted to chromatid aberration hot spots. *Mutagenesis.* 15(6):503-506.
- Moller P. 2005. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 96: 1-42.
- Navarrete MH, Carrera P, de Miguel M, de la Torre C. 1997. A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. *Mutat Res.* 389:271-277.
- Olive PL. y Banath JP. 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols.* 1(1):23-9.

- Ostling O. y Johanson KJ. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 123(1):291-298.
- Patlolla AK, Berry A, May L, Tchounwou PB. 2012. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Vicia faba*: a pilot study on the environmental monitoring of nanoparticles. *Int J Environ Res Public Health* 9(5):1649-1662.
- Pourrut B, Jean S, Silvestre J, Pinelli E. 2011. Lead induced DNA damage in *Vicia faba* root cells: potential involvement of oxidative stress. *Mutat Res* 726(2):123-128.
- Shaposhnikov S, Salenko VB, Brunborg G, Nygren J, Collins A. 2008. Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): loops or fragments?. *Electrophoresis.* 29:3005-3012.
- Singh NP. y Stephens RE. 1997. Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms and DNA electrostretching. *Mutat Res.* 383:167-175.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175(1):184-191.
- Speit G, Hartmann A. 2005. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol Biol.* 291:85-95.
- Ventura L, Giovannini A, Savio M, Dona M, Macovei A, Buttafava A, Carbonera D, Balestrazzi A. 2013. Single cell gel electrophoresis (comet) assay with plants: research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. *Chemosphere* 92(1):1-9.
- Xiao RY, Wang Z, Wang CX, Yu G, Zhu YG. 2006. Genotoxic risk identification of soil contamination at a major industrialized city in northeast China by a combination of *in vitro* and *in vivo* bioassays. *Environ Sci Technol.* 40(19):6170-6175.

PARTICIPACIÓN DE LOS HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EN LA MICORREMEDIACIÓN

INTRODUCCIÓN

El suelo como parte integradora de los ecosistemas, ocupa una posición clave en los ciclos globales de la materia. En él se desarrollan una amplia variedad de interrelaciones, que favorecen el intercambio de materia y energía entre el aire, agua y las partículas que lo conforman (Pidwirny y Jones, 2010). El suelo recibe el impacto de las actividades antrópicas trayendo como consecuencia el incremento de una gran variedad de contaminantes entre los que se encuentran: metales pesados (MP), compuestos orgánicos (hidrocarburos derivados del petróleo, benceno, etilbenceno, xileno, bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, tricloroetileno), así como residuos de pesticidas, herbicidas, fungicidas y antibióticos (ITRC, 2009; Saier y Trevors, 2010) (Figura 1).

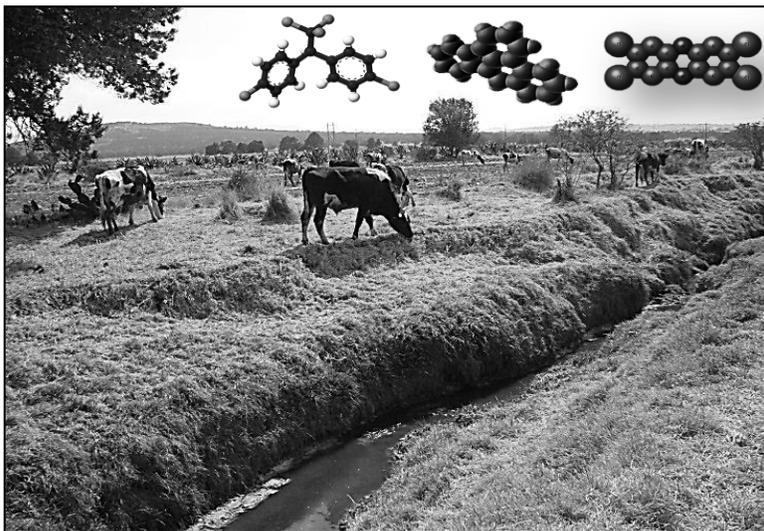


Figura 1. El suelo: importancia y contaminación

Luna-Zendejas HS. 2013. Participación de los hongos micorrízicos arbusculares en la micorremediación En: *Evaluaciones ecotoxicológicas* (García-Nieto *et al.*) Universidad Autónoma de Tlaxcala, México. p. 101-119.

La emisión de MP produce graves problemas ecotoxicológicos, el mercurio, el cadmio, el cromo, y el plomo son los que más preocupan con relación a la salud humana, sin olvidar el impacto en el medio ambiente, debido a que pueden formar parte de las cadenas alimenticias (Atlas y Bartha, 2002). En cualquier caso, es importante resaltar que los metales tóxicos en los suelos no pueden ser destruidos, sino sólo neutralizados y que pequeñas variaciones en las condiciones del medio edáfico pueden liberar a los metales anteriormente insolubilizados, por lo que es necesario realizar un seguimiento de la distribución de estos contaminantes en el suelo, especialmente de los más tóxicos.

La recuperación de suelos contaminados se puede lograr a través de diferentes técnicas y tecnologías en función de los propósitos, de las propiedades del suelo, de la extensión de la zona contaminada y del costo económico. Algunos de estos procedimientos son las técnicas de contención (aislamiento del contaminante en el suelo por barreras físicas), de confinamiento (por inmovilidad de los contaminantes) y de descontaminación (disminución de las concentraciones de los contaminantes) (Kaifer *et al.*, 2004).

Además, existen diferentes procesos de remediación biológica que aprovechan la capacidad depuradora de las plantas para la remoción de los contaminantes a través de su degradación por diversos microorganismos de la rizósfera, cuyo principio básico consiste

en destruir o modificar los materiales contaminantes con el fin de disminuir su peligrosidad. La biorremediación es una opción factible al utilizar plantas naturales o modificadas genéticamente, asociadas a microorganismos rizosféricos (Lasat, 2002; Bento *et al.*, 2012).

En ésta alternativa se incluyen a la biomineralización, que consiste en la síntesis de minerales por organismos vivos o biomateriales; la biosorción, con una amplia variedad de organismos vivos y biomasa muerta de bacterias, algas, hongos, y plantas los cuales son capaces de secuestrar metales tóxicos de los flujos de residuos; la fitoestabilización, en la cual las plantas tolerantes a metales se usan para reducir la

movilidad de los mismos; la hiperacumulación, las plantas son utilizadas para concentrar metales en sus partes aéreas; la dendrorremediación, realizada por medio del cultivo de árboles en suelos contaminados; la bioestimulación, se efectúa usando los exudados radicales para promover el desarrollo de microorganismos con capacidades de degradación como bacterias y hongos; la rizorremediación, que consiste en que las raíces de las plantas se utilizan para absorber, precipitar y concentrar MP a partir de efluentes líquidos contaminados y degradar compuestos orgánicos; la cianorremediación, se lleva a cabo al estimular el desarrollo de las algas para la recuperación de cuerpos de agua; la genorremediación, consistente en la estimulación de un gen capaz de actuar en el proceso de remediación, finalmente la micorremediación, con la que se busca estimular el micelio de los hongos para realizar una ultrafiltración de los contaminantes (Mani y Kumar, 2013).

Para entender este proceso es importante indicar que las plantas a través de su sistema radical, proveen un nicho a diversos microorganismos que habitan el suelo, como hongos y bacterias, además, las raíces de las plantas secretan diversos compuestos como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, flavonoides, vitaminas, purinas, enzimas, hormonas, iones inorgánicos y CO₂ (Besserer *et al.*, 2006; Steinkellner *et al.*, 2007), los cuales cumplen diversas funciones, como el atraer y repeler químicos en el área circundante al sistema radical. Los flavonoides fomentan una sim-

biosis benéfica entre leguminosas y bacterias del género *Rhizobium*, al activar los genes inductores de la formación de los nódulos, por otro lado los hongos formadores de micorrizas establecen una simbiosis con raíces de diversas plantas, muchas de ellas de interés agrícola, como es el maíz, sorgo, frijol y tabaco, entre otras. Específicamente las estrigolactonas estimulan la germinación, crecimiento y ramificación de las hifas de las esporas de los hongos, micorrízicos arbusculares (HMA), eventos que son cruciales en el reconocimiento de las raíces de la planta hospedera y establecimiento de la asociación simbiótica (Steinkellner *et al.*, 2007; Requena *et al.*, 2007).

La micorriza se ha defi-

nido como la asociación simbiótica mutualista entre determinadas especies de hongos del suelo y las raíces de diferentes especies de plantas, es decir, se trata de la unión integral e íntima de ayuda mutua entre el micelio y las raíces de diversas plantas, basada en el intercambio bidireccional de nutrientes (Smith y Read, 2008). El hongo proporciona a la planta nutrientes del suelo, principalmente fósforo, a cambio de hidratos de carbono fotosintéticos (Karan dashov y Bucher, 2005), mejora la nutrición mineral y aumenta su tolerancia al estrés hídrico (Zhu *et al.*, 2010), actúan como agentes de biocontrol de hongos patógenos (Al-Askar y Rashad, 2010) y reducen la sensibilidad a las sustancias tóxicas presentes en el suelo (Vivas *et al.*, 2003).

Se han establecido distintos tipos de micorriza tomando en cuenta los grupos de hongos implicados

en la formación de la asociación (tabla 1). Los organismos que presentan un micelio aseptado (Glomeromycota) y los que se caracterizan por poseer un micelio septado (Ascomicetes y Basidiomicetes) (Smith y Read, 2008).

La micorriza arbuscular es la más común, se presenta en cerca del 85 % de las especies vegetales (Klironomos *et al.*, 2000; van der Heijden y Sanders, 2002); como

Tabla 1. Clasificación de las asociaciones micorrízicas según Smith y Read (2008)

Tipo	Hospederos	Hongos
Micorriza Arbuscular	Briofitas	Glomeromycota
	Pteridofitas	
	Gimnospermas	
	Angiospermas	
Ectomicorriza	Gimnospermas	Ascomicetes
	Angiospermas	Basidiomicetes
Ectendomicorriza	Angiospermas	Glomeromycota
	Gimnospermas	Ascomicetes
Micorriza Arbutoide	Angiospermas	Basidiomicetes
Micorriza Monotropeide	Ericales	Basidiomicetes
Micorriza Ericoide	Monotropeoideae	Basidiomicetes
	Ericales	Ascomicetes
Micorriza Orquidoide	Briofitas	Basidiomicetes
	Orquidáceas	

en la mayoría de las angiospermas (plantas con flores), en pteridofitas (helechos y licopodios), en algunas gimnospermas (árboles o arbustos sin fruto) y en rizoides de musgos (Schüßler, 2000; Zhang y Liang-Dong, 2007; Fonseca y Berbara, 2008).

Se ha definido como una asociación simbiótica mutualista que se ha establecido entre el micelio de hongos del suelo del filum Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001; Schüßler y Walker, 2010) y las raíces de diversas plantas (Figura 2).

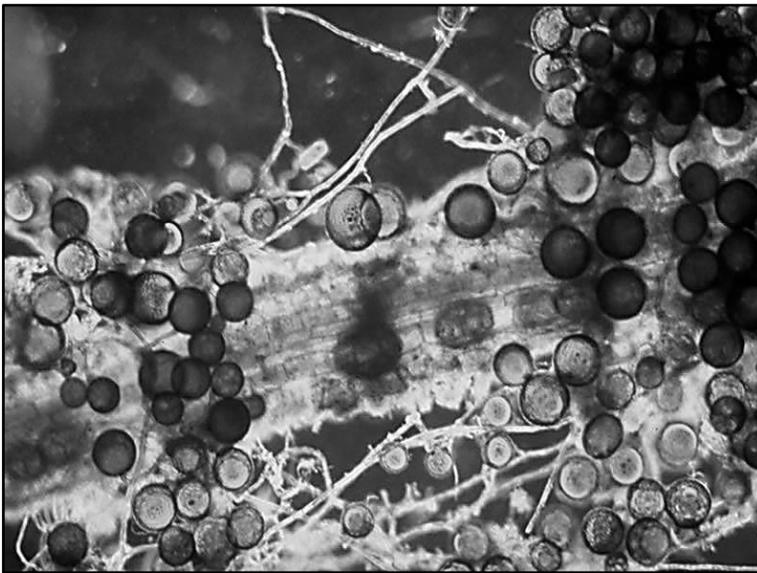


Figura 2. Raíz y esporas del hongo formador de micorriza arbuscular, *Glomus intraradices*

Los HMA producen clamidosporas asexualmente (Figura 3), éstas son esféricas con cientos de núcleos y con una pared constituida por varias capas, su tamaño varía entre 20 y 1000 μm de diámetro; se pueden formar por separado, en grupos o agregados llamados carpóforos y las hifas de su micelio carecen de

septos distribuidos regularmente (Gerdemann y Trappe, 1974; Bécard y Pfeffer, 1993; Schüßler *et al.*, 2001).

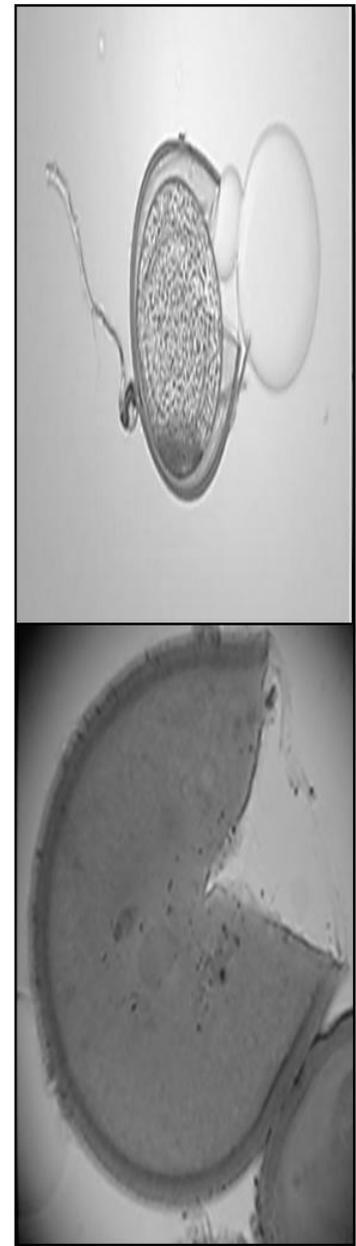


Figura 3. Esporas de hongos micorrízicos arbusculares (100X)

La interacción planta-HMA ha originado la existencia de un ambiente complejo definido como micorrizósfera (Figura 4), que es la rizósfera de una planta micorrizada, donde los exudados radicales juegan un papel importante con la secreción de moléculas de señalización, así como el micelio fúngico en donde ambos pueden mejorar las propiedades físicas y químicas del suelo, influyendo también en la composición de las poblaciones microbianas (Linderman, 2008).

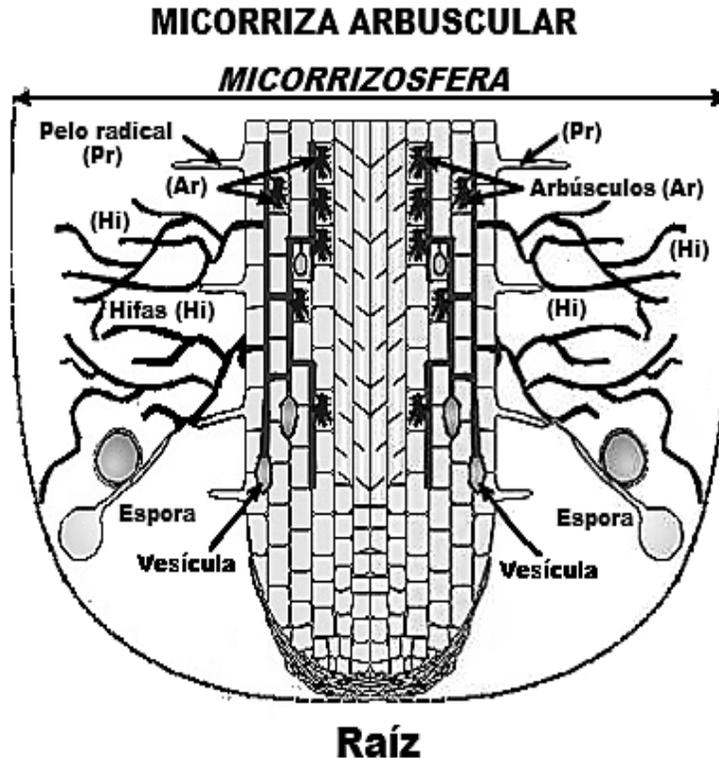


Figura 4. Representación esquemática de un corte vertical de una raíz, en donde se muestra el área conocida como Micorrizósfera (tomada y modificada de página web del INVAM - www.invam.caf.wvu.edu)

La micorremediación es una atractiva estrategia para la remediación de suelos contaminados. A través de

la relación mutualista entre las plantas y los HMA, los cuales son fundamentales en el establecimiento y desarrollo de las plantas en sitios severamente perturbados. El hongo inmoviliza el metal por precipitación de gránulos de polifosfato en el suelo, compuestos secretados por el hongo como la Glomalina (glicoproteína), estabiliza el Cu, Pb, Al y Cd en el suelo, y en las raíces de las plantas (González-Chávez *et al.*, 2004; Dudhane *et al.*, 2012), la adsorción a las paredes celulares de los hongos, y la quelación de metales en el interior del micelio del hongo.

Fernández - Fernández *et al.* (2008) determinaron que la cepa de *Glomus mosseae* (BEG-25) contribuyó significativamente en la acumula-

ción de Zn en las raíces de *Viola calaminaria* (pasto) y en plantas de sorgo (*Sorghum vulgare*), además esta misma cepa de *Glomus* inmovilizó al Cd, Pb y Zn (Cuellar-Sánchez *et al.*, 2011). Por otra parte Kuo *et al.* (2013) observaron que las plantas de *Bidens pilosa* (aceitilla) con y sin inoculación con *Glomus mosseae* presentaron los mayores porcentajes de remoción de petróleo crudo (66 y 68 %, respectivamente) a una concentración de 100,000 mg kg⁻¹, con respecto al tratamiento control (51 %).

Ventajas de la micorremediación

La micorriza arbuscular se desarrolla en alrededor del 85 % de las plantas vasculares. Además se ha observado la presencia de poblaciones naturales de HMA en suelos contaminados. Varias especies de HMA producen xilanasas, manasas y glicanasas que degradan compuestos peligrosos. Los HMA tienen el potencial de ser una opción de rehabilitación a menor costo con relación a las tecnologías físicas y químicas. Son una herramienta importante en el secuestro de carbono y pueden sostenerse bajo condiciones de campo por largos periodos.

Desventajas de la micorremediación

Posibles dificultades en el establecimiento de las especies de plantas micorrizadas en suelos contaminados es la selección inadecuada de especies de HMA para colonizar suelos contaminados y sobrevivir el tiempo suficiente para lograr los objetivos del tratamiento. Los niveles de tolerancia por las plantas a los

MP, no son evidentes en todas las asociaciones micorrízicas.

El primer paso para llevar a cabo la micorremediación es identificar las especies de HMA y plantas nativas, y cuales se pueden desarrollar en áreas contaminadas para poder implementar estrategias de remediación, seleccionado organismos capaces de inmovilizar a un contaminante específico (Stamets, 2005).

En este capítulo se describen las técnicas que permitirán conocer la magnitud de la contaminación de un sitio a través del estudio de la microbiota y fitobiota para establecer el protocolo de micorremediación que permita la recuperación de un sitio contaminado.

OBJETIVO

Explicar los procesos de tinción, porcentaje de colonización micorrízica, extracción, aislamiento y determinación de los hongos micorrízicos arbusculares como un primer paso para implementar estrategias de micorremediación de suelos contaminados.

MATERIAL

Agitador magnético
Agujas de disección
Arena
Bolsas plásticas transparentes (60 x 30 cm)
Cajas Petri (100 mm DE)
Cubreobjetos (18 x 18 mm)
Espátulas
Etiquetas
Frasco gotero de vidrio ámbar (100 ml)
Guantes de látex
Llenador de pipeta <2 ml (Profillette™ 406)
Marcadores de tinta indeleble
Matraz Erlenmeyer (125, 250, 500 y 1000 ml)
Matraz volumétrico (500 y 1000 ml)
Pala recta
Picetas de plástico (125 y 500 ml)
Pinzas de disección
Pipetas Pasteur
Pipetas serológicas (5 y 10 ml)
Placas de porcelana con 6 y 12 cavidades
Portaobjetos (76 x 26 mm)
Probetas (10, 50, 100 y 250 ml)
Tamices (0.5, 0.212, 0.106, 0.05 y 0.045 mm)
Termómetro de -10 a 110 °C
Tijeras
Tubo para centrifuga (15 o 50 ml)
Varilla de vidrio (10 mm de grosor)
Vaso de precipitado (50, 100, 500 y 1000 ml)

EQUIPO

Balanza analítica
Balanza granataria
Cámara fotográfica
Centrifuga
Microscopio óptico
M. estereoscópico
Placa de agitación
Refrigerador

REACTIVOS

Nombre	Marca	Catálogo
Ácido clorhídrico - HCl	JT BAKER	9530-36
Ácido láctico - C ₃ H ₅ O ₃	MERCK	100366
Agua destilada - H ₂ O	JT BAKER	4220-20
Alcohol polivinílico - (C ₄ H ₆ O ₂ * C ₂ H ₄ O)n	MERCK	141353
Azúcar comercial		
Azul de Tripán - C ₃₄ H ₂₄ N ₆ Na ₄ O ₁₄ S ₄	MERCK	111732
Glicerina - (HOCH ₂) ₂ CHOH	JT BAKER	2136-02
Hidrato de cloral - Cl ₃ CCH(OH) ₂	MERCK	102425
Hidróxido de amonio al 30 % (NH ₄ OH)	JT BAKER	9733-03
Peróxido de hidrógeno al 30 % (H ₂ O ₂)	JT BAKER	2186-03

PREPARACIÓN DE REACTIVOS**Ácido clorhídrico (HCl) al 10 %**

Diluir 10 ml de ácido clorhídrico en agua desionizada, agitar y aforar a 100 ml. Almacenar en frasco de vidrio color ámbar durante una semana como máximo.

Hidróxido de potasio (KOH) al 10 %

Diluir 10 g de hidróxido de potasio en agua destilada y aforar a 100 ml. Almacenar en frasco de vidrio color ámbar durante una semana como máximo.

Alcohol polivinílico (PVLG)

En un frasco gotero de vidrio ámbar añadir 10 ml de agua destilada y 1.66 g de alcohol polivinílico, agitar y calentar en baño maría a 80 °C durante 6 h, adicionar 10 ml de ácido láctico y 1 ml de glicerina, seguir la agitación por 10 min. Reposar la solución 24 h antes de utilizarse. Almacenar en el mismo frasco gotero, a temperatura ambiente hasta un año máximo.

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 10 %

Diluir 15 ml de peróxido de hidrógeno al 30 % con 30 ml de agua destilada. No almacenar.

Peróxido de hidrógeno alcalinizado

Diluir 30 ml de peróxido de hidrógeno al 10 % en agua destilada y añadir 3 ml de hidróxido de amonio al 30 %, agitar y aforar a 600 ml con agua destilada. Este reactivo se prepara al momento y no se almacena.

Sacarosa al 50 %

Diluir 50 g de azúcar comercial en agua destilada y aforar a 100 ml. Almacenar en frasco de vidrio ámbar durante 1 semana como máximo.

Lactoglicerol 1:2:1

Mezclar 25 ml de ácido láctico, 50 ml de glicerina y 25 ml de agua desionizada, agitar y almacenar en frasco de vidrio ámbar hasta por un año.

Azul de tripano 0.05 %

Disolver 0.05 g de azul de tripano en la solución de lactoglicerol y aforar a 100 ml. Almacenar en frasco de vidrio hasta 1 año.

Solución madre de yodo

Diluir 1 g de yodo y 3 g de yoduro de potasio en agua destilada, agitar y aforar a 70 ml. Almacenar en frasco de vidrio durante 1 año como máximo.

Reactivo de Melzer

Mezclar 5 ml de la solución madre de yodo con 5 g de hidrato de cloral cristalizado, agitar y depositar en un gotero de vidrio color ámbar. Almacenar en frasco de vidrio durante 1 año como máximo.

METODOLOGÍA

Muestreo de raíces de plantas

La recolección del sistema radical se realiza perforando con una pala recta la zona rizosférica de la planta a una profundidad de entre 15 y 20 cm apro-

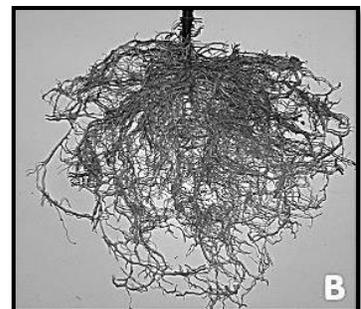
ximadamente, abarcando una periferia de 15 cm circundante al tallo, se extrae la raíz depositándola en bolsas de polietileno etiquetadas con los datos de la zona de recolección, fecha, etc. (Figura 5).



Extracción de la planta



Sistema radical



Raíz limpia

Figura 5. Muestreo de la planta y del sistema radical

Las plantas recolectadas se secan y prensan de acuerdo a lo establecido en las técnicas de la botánica, para su determinación taxonómica (Figura 6).



Recolección



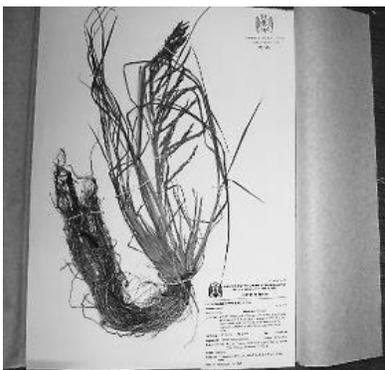
Prensado



Secado



Montaje



Determinación



Almacenaje

Figura 6. Montaje, secado y determinación taxonómica de la planta

Tinción de raíces

Las raíces de las plantas se tiñen para determinar el porcentaje de colonización micorrízica, a través de la técnica de Phillips y Hayman (1970). Lavar con agua para eliminar las partículas de suelo y colocar las raíces en un vaso de precipitado. Agregar hidróxido de potasio al 10 %, calentar entre 60 a 90 °C en baño María de 15 a 30 min, o hasta 4 h con base en las características de pigmentación de las raíces. Enjuagar con agua, sumergirlas en ácido clorhídrico al 10 % y dejarlas en reposo por 10 min. Escurrir y sin enjuagar, se agrega el azul de tripano al 0.05 % por 24 h a temperatura ambiente. Para su conservación se guardan a 4 °C en lactoglicerol (Figura 7).



Raíz lavada



Raíces en KOH (10 %)



Raíces en HCl (10 %)



Raíces teñidas

Figura 7. Proceso de tinción de las raíces utilizando azul de tripano

NOTA:

A menudo se eliminan los pigmentos fenólicos de las raíces sumergiéndolas en KOH al 10 % durante 10 min, de no ser así se adiciona además, peróxido de hidrógeno alcalino para eliminar cualquier compuesto fenólico que permanezca en las raíces clareadas (Bevege, 1968; Kormanik y Mc Graw, 1982).

Porcentaje de colonización micorrízica

Se toman 20 fragmentos de raíz de 2 cm de largo, se acomodan sobre un portaobjetos, en forma paralela, se adicionan 3 o 4 gotas de alcohol polivinílico, se coloca un cubreobjetos y se dejan secar las preparaciones a temperatura ambiente por una semana, se etiquetan debidamente. Se elaboran tres preparaciones por cada muestra se obtiene la media y la desviación estándar.

Las preparaciones se observan en un microscopio óptico bajo el objetivo 10X. Se inicia por uno de los extremos del primer segmento de la raíz, a partir de ahí se visualiza de manera horizontal recorriendo todos los segmentos de ésta, al llegar al último se mueve la platina ver-

ticamente y se detiene en la parte media. El procedimiento se repite una vez más en el extremo inferior, hasta completar 60 campos (McGonigle *et al.*, 1990) (Figura 8). Al observar cada campo se registra la presencia (+) o ausencia (-) de las estructuras fúngicas para ser contabilizadas y se determina el porcentaje de colonización con la siguiente ecuación:

$$(Ec. I) \% colonización = \frac{\# \text{ campos colonizados}}{\# \text{ total de campos colonizados}} \times 100$$

Extracción y cuantificación de esporas de HMA

De la muestra de suelo rizosférico de las plantas recolectadas en el sitio contaminado se extraen las esporas de HMA siguiendo la técnica de tamizado húmedo y decantación (Brundrett, 2008), la cual consiste en tomar 100 g de suelo rizosférico y colocarlos en un vaso de precipitado al que se le agregan 900 ml de agua, ésta suspensión se mezcla vigorosamente por 30 s, se deja reposar de 4 a 5 min y el sobrenadante se decanta sobre una serie de tamices de diferente tamaño de abertura (0.500 mm, 0.212 mm, 0.106 mm y 0.050 mm) ensamblados de mayor a menor tamaño, con el fin de separar las esporas, el proceso anterior se repite cinco a seis veces.

El material retenido de cada uno de los tamices se deposita en tubos de ensayo y se añaden 50 ml de agua, se centrifuga a 2000 rpm durante 5 min, el sobrenadante se deshecha.



Figura 7. Elaboración de preparaciones para determinar la colonización micorrízica

Posteriormente el material retenido en el fondo de cada tubo se centrifuga con 50 ml de sacarosa al 50 % a 2000 rpm durante un minuto, el sobrenadante se vacía en un tamiz de 0.045 mm para lavarse con agua y transferirlo a una caja Petri (Figura 9).

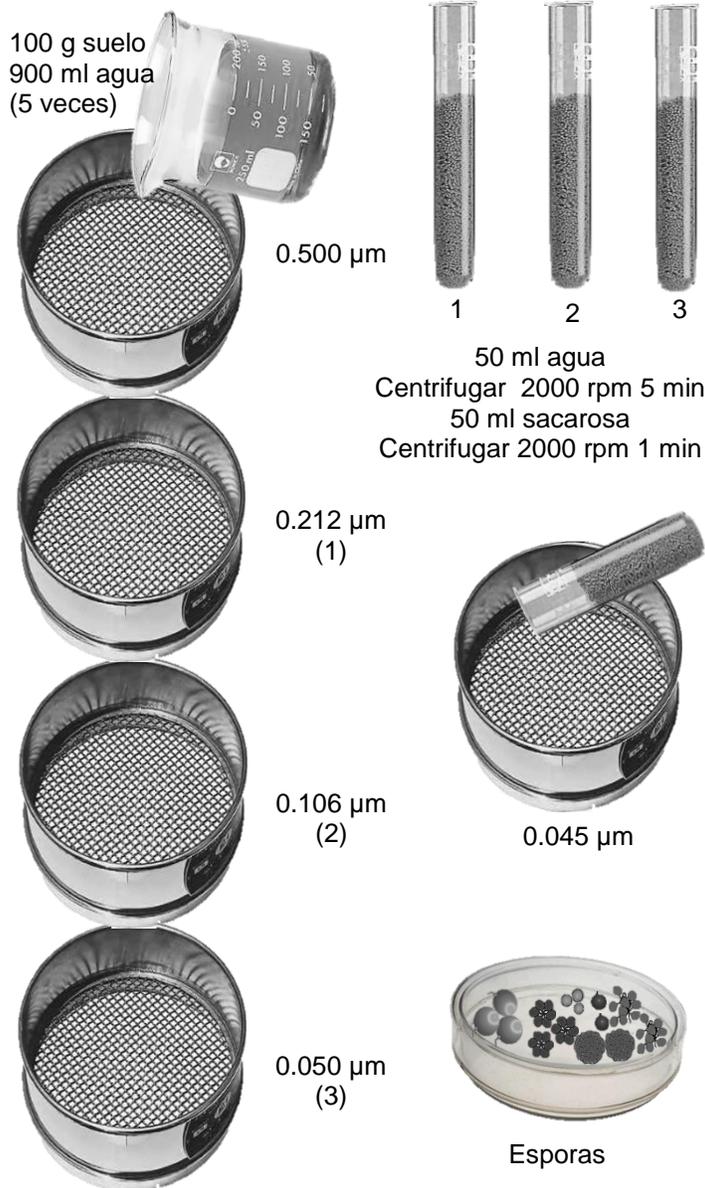


Figura 9. Extracción de esporas de HMA a través de la técnica de tamizado húmedo y decantación

Mediante la observación con un microscopio estereoscópico se separan y agrupan las esporas en morfotipos con base en su tamaño, forma y presencia de la hifa de sostén y color (Figura 10).

Posteriormente se realiza el conteo total de esporas, que previamente se separaron y agruparon en morfotipos, empleando un microscopio óptico con aumento de 10X (Figura 11).

Se toman en cuenta las esporas con aspecto físico saludable, pared sin perforaciones, contenido brillante y con gránulos lipídicos.

Los resultados se expresan como el número de esporas por gramo de suelo seco, con la siguiente ecuación:



Figura 10. Separación y agrupamiento de esporas de HMA



Figura 11. Conteo de esporas de HMA

$$(Ec. II) \quad E/100g = \frac{NEC}{SRH} \times 100$$

Donde:

E/100 g = esporas en 100 g de suelo rizosférico seco

NEC = número de esporas contabilizadas en el suelo húmedo (100 g) resultado del proceso de extracción.

SRH = suelo rizosférico seco que se obtiene al realizar el porcentaje de humedad de 100 g de suelo.

Se multiplica por 100 para obtener el número de esporas en 100 g de suelo rizosférico seco.

Determinación taxonómica de los HMA

Las preparaciones sirven de referencia para la identificación de los géneros de HMA, se realizan de acuerdo con las técnicas de Schenck y Pérez (1990) y Zhu *et al.* (2010).

Se toman cuarenta esporas de cada tipo, veinte esporas se depositan en un extremo del portaobjetos agregándoseles una gota de alcohol polivinílico, y las otras 20 en el otro extremo se les adiciona una gota de alcohol polivinílico con reactivo de Melzer, como medio de montaje. Se dejan secar las preparaciones durante algunas horas y posteriormente se hace presión sobre el cubreobjetos para romper las esporas, lo cual permite observar los estratos de la pared, característica que es importante para su separación taxonómica (Figura 12).

NOTA:

El reactivo de Melzer es uno de los más empleados en la microscopia de hongos, se utiliza con el propósito de detectar si los estratos externos o internos constituyentes de la pared de las esporas, presentan una reacción amiloidea (púrpura) que indica que el estrato contiene almidón, esto se detecta si se observa un cambio de color de gris azulado a azul negruzco; si la coloración cambia a marrón a rojizo o a rojo oscuro la reacción revela la presencia de dextrinas, (Morton, 1987), características que han sido considerada para separar morfoespecies.



Esporas de HMA

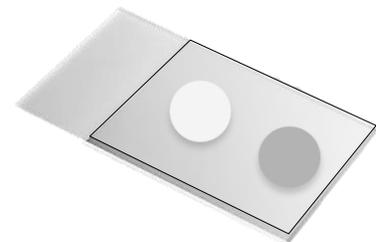
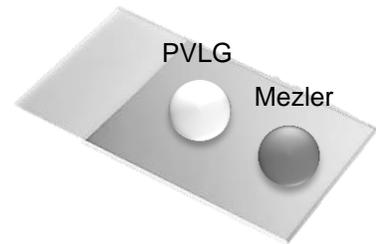


Figura 12. Elaboración de preparaciones permanentes

La determinación de cada género se realiza con la ayuda de un microscopio óptico y se apoya en la literatura especializada de Schüßler y Walker (2010) y las guías del INVAM (www.invam.caf.wvu.edu) (Figura 13).

Finalmente para establecer el protocolo de micorremediación, con el propósito de recuperar un sitio contaminado, será necesario llevar a cabo la propagación de las esporas de los HMA para generar un inoculante micorrízico.

Para inocular diversas especies de plantas y probar su efectividad en la remoción de contaminantes del suelo y de poder elegir a la planta así como la cepa o consorcio de HMA que podrán utilizarse en la micorremediación.

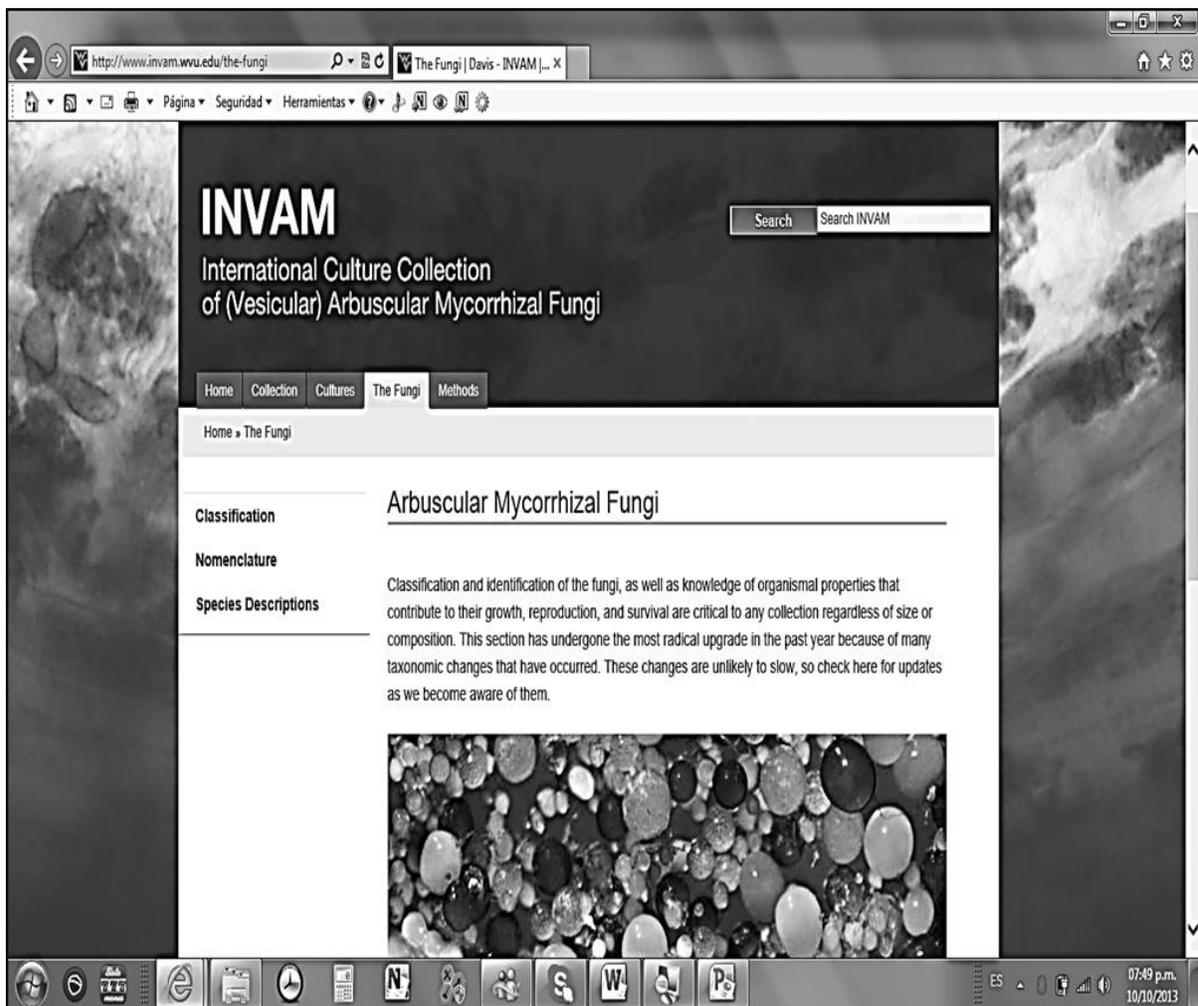


Figura 13. Página web del INVAM (www.invam.caf.wvu.edu)

LITERATURA CITADA

- Al-Askar AA, Rashad YM. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi: A biocontrol agent against common bean *Fusarium* root rots disease. *Plant Pathol J* 9:31-38.
- Atlas MR, Bartha R. 2002. *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. 4ª ed. Pearson Educación, S. A., Madrid, Esp. 677 p.
- Bécard G, Pfeffer PE. 1993. Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in-vitro development. *Protoplasma* 174:62-68.
- Bento RA, Saggin-Júnior OJ, Pitard RM, Stralioetto R, Ribeiro da Silva EM, de Lucena Tavares RS, Teixeira Gerken de Landa FH, Martins LF, Garcia Torres Volpon A. 2012. Selection of Leguminous Trees Associated with Symbiotic Microorganisms for Phytoremediation of Petroleum-Contaminated Soil. *Water Air Soil Pollut* 223:5659-5671.
- Besserer A, Puech-Pages V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais JC, Roux Ch, Bécard G, Séjalon-Delmas N. 2006. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *Plos Biol* 4: 1239-1247.
- Bevege DI. 1968. A rapid technique for clearing tannins and staining intact roots for detection of mycorrhizas caused by *Endogone* spp. and some records of infection in Australasian plants. *Trans Br Mycol Soc* 51:808- 810.
- Brundrett MC. 2008. Methods for Identifying Mycorrhizas. En: *Mycorrhizal Associations: The Web Resource*. Version 2.0. Date accessed. <mycorrhizas.info>.
- Cuellar-Sánchez A, González-Chávez MCA, Carrillo-González R. 2011. Production of extraradical mycelium and its metal immobilization capacity in the association *Glomus mosseae* (BEG25)-Sorghum. *RedICA* 2(3):1-11.
- Dudhane M, Borde M, Jite PK. 2012. Effect of aluminium toxicity on growth responses and antioxidant activities in *Gmelina arborea* Roxb inoculated with AM Fungi. *Int J Phytoremediat* 14(7):643-655.
- Fernández-Fernández O, Carrillo-González R, Vangrosveld J, González-Chávez MC. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi and Zn accumulation in the metallophytic plant *Viola calaminaria* (Gingins.) Lej. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(3):355-360.
- Fonseca HMAC, Berbara RLL. 2008. Does *Lunularia cruciata* form symbiotic relationships with either *Glomus proliferum* or *G. intraradices*?. *Mycol Res* 112:1063-1068.
- Gerdemann JW, Trappe JM. 1974. *Endogonaceae* in the Pacific Northwest. *Mycol Mem* 5:1-76.
- González-Chávez, M.C., R. Carrillo-González, S. Wright and K. Nichols. 2004. Role of Glomalinal, protein produced by hypha of arbuscular mycorrhizal fungi in the sequestration of potentially toxic elements. *Environ Pollut* 130:317-323.
- ITRC, 2009. *Phytotechnology technical and regulatory guidance and decision trees*, revised. PHYTO-3. Washington, D.C.: Interstate Technology and Regulatory Council, Phytotechnologies Team, Tech Reg Update. <http://www.itrcweb.org>. Accessed 03 September 2013.
- Kaifer MJ, Aguilar A, Arana A, Balseiro C, Torá I, Caley JM, Pijls C. 2004. *Guía de tecnologías de recuperación de suelos contaminados*. Comunidad de Madrid, Consejería de medio ambiente y ordenación del territorio. Madrid. 175 p.
- Karandashov V, Bucher M. 2005. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Science* 10:22-29.
- Klironomos JN, McCune J, Hart M, Neville J. 2000. The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. *Ecol Lett* 3:137-141.
- Kormanik PP, McGraw AC. 1982. Quantification of vesicular arbuscular mycorrhizae in plant roots. En: Schenck NC (ed). *Methods and principles of mycorrhizal research*. The Amer Phytopathol Soc. St. Paul. 37-45 p.
- Kuo HC, Juang DF, Yang L, Kuo WC, Wu YM. 2013. Phytoremediation of soil contaminated by heavy oil with plants colonized by mycorrhizal fungi. *Int J Environ Sci Technol*. DOI10.1007/s13762013-0353-6
- Lasat HA. 2002. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *J Environ Qual*. 31(1):109-120.
- Linderman RG. 2008. The mycorrhizosphere phenomenon. En: Feldman F, Kapulnik Y, Barr J (Eds.). *Mycorrhiza Works*. Deutsche Phytomedizinische Gesell-

- schaft, Braunschweig, Germany. 341-355 p.
- Mani D and Chitranjan Kumar Ch. 2013. Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* DOI 10.1007/s13762-013-0299-8
- McGonigle, T. P., M. H. Miller, D. G. Evans, G. L. Fairchild y J. A. Swan. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115:495-501.
- Morton JB. 1987. Effects of mountants and fixatives on wall structure and Melzer's reaction in spores of two Acaulospora species (Endogonaceae). *Mycologia* 78:787-794.
- Phillips JM, Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing root and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55:158-161.
- Requena N, Serrano E, Ocón A, Breuninger M. 2007. Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* 68: 33-40.
- Saier MH & Trevors JT. 2010. Phytoremediation. *Water Air Soil Pollut* 205 (1):S61-S63.
- Schenck NC, Pérez Y. 1990. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. INVAM. Univ. of Florida, Gainesville, FL. 245 p.
- Schüßler A. 2000. *Glomus claroideum* forms an arbuscular mycorrhiza-like symbiosis with the hornwort *Anthoceros punctatus*. *Mycorrhiza* 10:15-21.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walter C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105:1413-1421.
- Schüßler A, Walker C. 2010. The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. Electronic version freely available online at www.amf-phylogeny.com
- Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd Ed. Academic Press. 787 p.
- Stamets P. 2005. *Mycelium running: how mushroom can help save the world*. Ten Speed Press, Crown Publishing Group, New York.
- Steinkellner S, Lenzemo V, Langer I, Schweiger P, Khaosaad T, Toussaint JP, Vierheilig H. 2007. Flavonoids and strigolactones in roots exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. *Molecules* 12: 1290-1306.
- Van der Heijden MGA, Sanders IR. 2002. *Mycorrhizal Ecology*. Springer. Berlin, Alemania. 469 p.
- Vivas A, Vörös I, Biró B, Ruiz-Lozano JM, Azcón R. 2003. Beneficial effects of indigenous Cd tolerant and Cd sensitive *Glomus mosseae* associated with a Cd adapted strain of *Brevibacillus brevis* in improving plant tolerance to Cd contamination. *Appl Soil Ecol* 24:177-186.
- Zhang Y, Liang-Dong G. 2007. Arbuscular mycorrhizal structure and fungi associated with mosses. *Mycorrhiza* 17:319-325.
- Zhu XC, Song FB, Xu HW. 2010. Arbuscular mycorrhizae improves low temperature stress in maize via alterations in host water status and photosynthesis. *Plant Soil* 331:129-137. <http://www.invam.caf.wv.u.edu> Dr. Morton JB, Dr. Amarasinghe R.

GLOSARIO

Ácidos orgánicos: compuestos oxigenados derivados de los hidrocarburos que se forman al sustituir en un carbono primario dos hidrógenos por un oxígeno que se une al carbono mediante un doble enlace, y el tercer hidrógeno por un grupo (OH) que se une mediante un enlace simple.

Adsorción: proceso de atracción de átomos, moléculas o iones de una sustancia en la superficie de otra, siendo el tipo más frecuente el de la adhesión de líquidos y gases en la superficie de los sólidos, formando películas líquidas o gaseosas.

Aminoácidos: molécula orgánica con un grupo amino y un grupo carboxilo, se combinan para formar proteínas y son los pilares fundamentales de la vida.

Anticuerpo policlonal: el anticuerpo es una proteína producida por el cuerpo en respuesta a una sustancia extraña. Es policlonal por ser sintetizado por múltiples poblaciones de células productoras de anticuerpo (en animales completos), difieren en su epítope de unión y complementariedad de la secuencia de aminoácidos, pero comparten especificidad por el antígeno.

Antígeno: proteína o polisacárido que el cuerpo combate preparando una respuesta inmunológica.

Ascomicetes: clase de hongos perfectos, con una variedad de formas y estructuras, desde unicelulares

hasta pluricelulares. Su estructura característica es el asca que contiene las ascósporas.

Basidiomicetes: clase de hongos perfectos que incluye aquellos que producen basidios con basidiosporas, incluye a las clásicas setas y hongos con sombrero.

Bioestimulación: consiste en estimular a los microorganismos autóctonos de un ambiente natural por medio de la adición de nutrientes, humedad y aireación del sistema para mejorar la eliminación de los contaminantes.

Biom mineralización: proceso por el cual un organismo vivo proporciona las bases químicas necesarias para nucleación y crecimiento de fases minerales únicas.

Biorremediación: intervenciones biológicas empleando diversos organismos para mitigar los efectos nocivos causados por contaminantes ambientales.

Biosorción: proceso por el que la biomasa microbiana, al actuar como un intercambiador iónico, es capaz de adherir y concentrar metales pesados en soluciones acuosas a través de las paredes celulares.

Cianorremediación: proceso que usa cianobacterias para remediar áreas contaminadas con metales.

Clamidosporas: esporas de origen asexual, recubiertas por una pared celular recia, que funcionan como esporas de resistencia o latencia.

Coleóptilo: funda que cubre la plúmula en el embrión de las gramíneas.

Congéneres: cada uno de los compuestos químicos que son similares en cuanto a estructura, origen función y/o efectos dañinos.

Cotiledón: la o las primeras hojas de la planta ya preformadas en el embrión de las plantas con semilla.

Cromógeno: sustancia que absorbe la luz produciendo color.

Dendrorremediación: proceso en el que se usan árboles para la eliminar, secuestrar o descomponer

químicamente contaminantes inorgánicos presentes en suelos.

Dicotiledónea: se aplica a la planta que presenta dos cotiledones una vez que la semilla germina. Por ejemplo, frijol, haba y garbanzo.

Enzimas: moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas.

Epicótilo: porción del tallo situada entre la inserción de los cotiledones y la extremidad caulinar. En las fanerógamas recibe este nombre el primer entrenudo que forma la plúmula al desarrollarse. Se opone al hipocótilo.

Espora: célula reproductora producida por ciertos hongos, plantas (musgos, helechos) y

algunas bacterias, bajo ciertas condiciones actúan como estructuras de resistencia.

Fitoestabilización: técnica en la que se establece una cubierta vegetal de especies leñosas para reducir al mínimo la movilidad de los metales pesados en suelos contaminados. Las raíces de las plantas y la biota microbiana al interactuar pueden inmovilizar los contaminantes orgánicos e inorgánicos.

Flavonoides: metabolitos secundarios de las plantas, son una familia muy diversa de compuestos no nitrogenados.

Genorremediación: proceso que a través de la manipulación genética establece las bases moleculares en las plantas para mejorar la tolerancia a metales pesados.

Glomina: es una glicoproteína, un compuesto de azúcar y proteína que participa en la formación de agregados del suelo.

Gramínea: se dice de las plantas angiospermas monocotiledóneas que tienen tallos cilíndricos, comúnmente huecos, interrumpidos de trecho en trecho por nudos llenos, hojas alternas que nacen de estos nudos y abrazan el tallo, flores muy sencillas, dispuestas en espigas o en panojas, y grano seco cubierto por las escamas de la flor; por ejemplo, el trigo, el arroz y sorgo.

Hidrocarburos: compuestos bioquímicos que forman el esqueleto de la materia orgánica, formados únicamente por un armazón de carbono al que se le unen átomos de hidrógeno.

Hiperacumulación: acción de algunas especies de plantas (tomate, mostaza, pasto Sudán, girasoles y geranio) en acumular altas cantidades de metales pesados en sus tejidos.

Hipocótilo: porción del tallo de un embrión o de la plántula situado entre los cotiledones y la radícula.

Homeostasis: el nombre está compuesto por dos vocablos griegos, homo = similar y estasis = estabilidad. Es una forma de equilibrio dinámico que consiste en la capa-

cidad de los organismos vivos para mantener una condición interna estable gracias a una red de sistemas de control realimentados que constituyen los mecanismos de autorregulación.

Hormonas: sustancias de composición química variable que regulan y coordinan el ciclo vital de las plantas e intervienen en la regulación de su desarrollo y crecimiento así como en su reproducción. Las auxinas, ácido abscísico, citoquinina, giberelina y el etileno son ejemplo de ellas.

Inmunoensayo: es una técnica inmunoquímica analítica que emplea complejos inmunes (uniones de anticuerpos y antígenos), para la cuantificación de una sustancia determinada. Se basa en la gran especificidad y afinidad de los anticuerpos por sus antígenos específicos y se usan los anticuerpos monoclonales o policlonales.

Iones: son partículas cargadas eléctricamente, constituidas por un átomo o molécula que no es eléctricamente neutra.

Leguminosa: se dice de las hierbas y matas, y de los arbustos y árboles angiospermos dicotiledóneos, con hojas casi siempre alternas, por lo general compuestas y con estípulas, flores de corola actinomorfa o zigomorfa, amariposada en muchas especies, y fruto en legumbre con varias semillas sin albumen. Estas plantas están comprendidas en las familias de las

Mimosáceas y de las Papilionáceas. Por ejemplo, haba, frijol y chícharo.

Micelio aseptado (cenocítico): hifas sin septos o tabiques transversales.

Micelio septado: hifas con septos o tabiques transversales que las dividen a intervalos regulares o irregulares.

Micelio: estructura filamentososa o masa de hifas que constituye el cuerpo de un hongo.

Micorremediación: proceso en el que se utilizan diversos hongos para degradar o secuestrar contaminantes en el medio ambiente, para reparar o restaurar el medio ambiente.

Micorrizosfera: es la zona del suelo ocupada

por la asociación micorrízica, la cual tiene dos componentes, la capa de suelo alrededor de las raíces micorrizadas y el suelo cercano a las hifas del hongo micorrízico o micelio externo que compone la hifosfera o micosfera.

Monocotiledónea: se aplica a la planta que tiene un solo cotiledón una vez que germina la semilla. Por ejemplo, la cebada, avena y trigo.

Mutualismo: interacción biológica entre individuos de diferentes especies, en donde ambos se benefician y mejoran su aptitud biológica.

Necrosis: es la degradación de un tejido por la muerte de sus células.

Nódulos radicales: se forman en asociación simbiótica por las bacterias del género *Rhizobium* y las raíces de las plantas leguminosas, es fundamental para el proceso de fijación biológica de nitrógeno.

Nódulos: agrupación de bacterias fijadoras de nitrógeno, en las raíces de Fabaceae (leguminosas).

Polifosfato: sales o los ésteres del ácido fosfórico. Tienen en común un átomo de fósforo rodeado por cuatro átomos de oxígeno en forma tetraédrica.

Purinas: estructura cíclica formada por cuatro átomos de nitrógeno y cinco de carbono de que derivan algu-

nas bases nitrogenadas, como la adenina y la guanina.

Quelación: habilidad de un compuesto químico para formar una estructura en anillo con un ion metálico, resultando en un compuesto con propiedades químicas diferentes a las del metal original y que impide que el metal continúe sus reacciones químicas normales.

Rizoide: estructura filamentosa que en ciertos vegetales, como musgos, líquenes y helechos, que hace las funciones de raíz.

Rizorremediación: uso de raíces de la planta para absorber, concentrar, y/o precipitar compuestos peligrosos, particularmente los metales pesados o radionúclidos.

Rizósfera: zona de interacción entre las raíces de las plantas y los microorganismos del suelo. Ocupa entre unos cuantos milímetros o algunos centímetros de la raíz. Se caracteriza por el aumento de la biomasa y actividad microbiana. La comunidad de la rizósfera consiste de microbiota (bacterias, hongos y algas), y micro y mesofauna (protozoos, nemátodos, insectos y ácaros).

Sensibilidad: son movimientos de las plantas inducidos por estímulos externos y a los cuales responden determinados órganos del vegetal.

Simbiosis: asociación en la que dos organismos de especies diferentes se relacionan para beneficiarse mutuamente en su desarrollo.

Subrogado: compuesto que sustituye a otro. En este inmunoensayo se utiliza el TMDD como subrogado para la curva estándar, sustituye a la 2478 TCDD.

Tamiz: utensilio formado por tela metálica o plástica sujeta a un aro metálico que sirve para separar las partículas finas de las gruesas de diversas matrices.

Tamizado: proceso de filtración que permite separar y retirar elementos sólidos gruesos de otros más finos.

Tolerancia. Es una resistencia en la cual una planta es capaz de resistir o se puede recuperar del daño causado por factores externos.

EVALUACIONES ECOTOXICOLÓGICAS

Se terminó de imprimir el 10 de Diciembre de 2013 en los talleres de
Conciencia Gráfica S.A de C.V. con domicilio en Fracc. Cabañas Lt. 2
Oasis, Valsequillo, Puebla y con número de teléfono y fax
01 222 281 7084

El tiraje consta de 1000 ejemplares

