



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**  
**POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA**

MECANISMOS DE TOLERANCIA DEL  
SIMBIOSISTEMA *Azolla-Anabaena azollae*  
ANTE ARSÉNICO Y COBRE

GABRIELA SÁNCHEZ VIVEROS

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

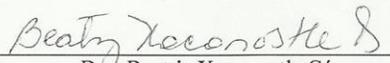
ENERO, 2012

La presente tesis titulada: **Mecanismos de tolerancia del simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae* ante arsénico y cobre**, realizada por la alumna: **Gabriela Sánchez Viveros**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

## DOCTORA EN CIENCIAS

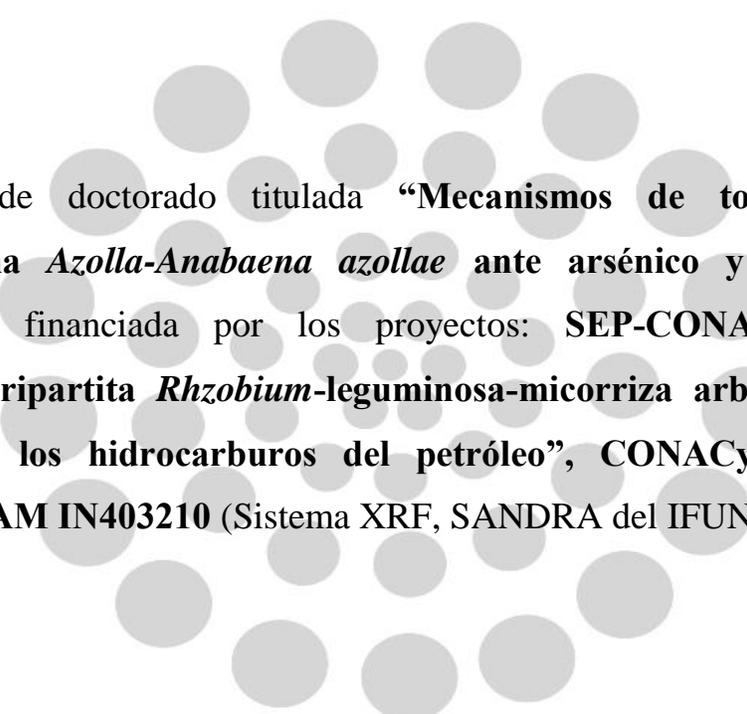
### EDAFOLOGÍA

#### CONSEJO PARTICULAR:

CONSEJERO:	
	Dr. Ronald Ferrera Cerrato
ASESOR:	
	Dr. Alejandro Alarcón
ASESORA:	
	Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera
ASESOR:	
	Dr. José Luis Ruvalcaba Sil
ASESORA:	
	Dra. Beatriz Xoconostle Cázares

Montecillo, Estado de México

2012



Esta tesis de doctorado titulada **“Mecanismos de tolerancia del simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae* ante arsénico y cobre”**, fue parcialmente financiada por los proyectos: **SEP-CONACYT 79456 “Simbiosis tripartita *Rhizobium*-leguminosa-micorriza arbuscular y su respuesta a los hidrocarburos del petróleo”**, **CONACYT 131944** y **PAPIIT UNAM IN403210** (Sistema XRF, SANDRA del IFUNAM).

**CONACYT**

## DEDICATORIAS

A **DIOS** y **MARÍA SANTÍSIMA** por bendecirme con el don de la vida, por permitirme ver la grandeza de su amor a través de la mano oportuna que me levantó, de los labios cuyas palabras y sonrisas me alentaron, de los oídos que me escucharon, por el corazón que, amistad, cariño y amor me dio; pero sobre todo por acompañarme y protegerme en cada momento de mi vida.

A mi pequeña dama **ITZEL M. VIVEROS SÁNCHEZ** por el tiempo de ausencia, por entender las veces en que no pude estar contigo, por esos ojos que con ternura y comprensión me miraron, por siempre impulsarme para llegar hasta el final del doctorado y por todo el amor que me regalas día a día. **ERES UNA BENDICIÓN, TE AMO.**

A la **DRA. ALEJANDRA SÁNCHEZ VIVEROS** y **DR. CUAUHTEMOC GALLARDO LEYVA** porque sin su comprensión, apoyo, tolerancia y mucho amor no hubiese podido llevar a buen término este trabajo doctoral. Pero especialmente, por darle la oportunidad a mi pequeña dama de tenerlos como padres.

Al **DR. RONALD FERRERA-CERRATO**, por brindarme un espacio en el área de microbiología y permitirme ser parte de su grupo de trabajo. Sus consejos, paciencia y opinión son un regalo excepcional para mi formación personal y profesional.

A mi amigo y confidente **DR. ALEJANDRO ALARCÓN** por su apoyo, comprensión y amistad sin condiciones ni medida. Por haber puesto en mí la mentalidad de que se puede ser cada vez mejor en lo que uno hace. Por ser digno ejemplo de persona e investigador. **GRACIAS**, por ser parte de mi vida durante mi búsqueda del saber.

## AGRADECIMIENTOS

Al **CONACYT** por la beca otorgada para mis estudios de doctorado, su apoyo lo convierte en gestor de la transformación de México.

Al **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**, por la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado.

A mi Padre **RAYMUNDO SÁNCHEZ GÓMEZ**, que aunque no está físicamente sobre la tierra estaría satisfecho de verme con este nuevo logro de vida profesional.

A mi Madre, **TIMOTEA VIVEROS-HERRERA** a quien le debo la vida, le agradezco el cariño, la comprensión, y el apoyo que me brindó en todo momento.

A mis hermanos **GILBERTO, ARTURO, LUCIA, ALEJANDRA y ROCÍO**, por su apoyo incondicional en mis decisiones y su fe ciega en mis proyectos, siempre han suplido las fuerzas que he necesitado para andar este camino.

A mi **FAMILIA**, gracias por el tiempo, por entender las veces en que no pude estar con ustedes y me impulsaron para llegar hasta este lugar. Me resulta difícil poder nombrarlos en tan poco espacio, sin embargo ustedes saben los llevo en mi corazón y les agradezco por ser quienes son.

A la familia **GALLARDO LEYVA**, por recibirme junto con mi pequeña dama como parte de ustedes y brindarnos el cariño y amor de familia. Doy gracias a **DIOS** por haberlos traído a mi vida.

A mi consejo particular, **DR. RONALD FERRERA CERRATO, DR. ALEJANDRO ALARCÓN, DRA. HILDA ARACELI ZAVALA MANCERA, DR. JOSÉ LUIS RUVALCABA SIL, y DRA. BEATRIZ XOCONOSTLE CAZÁRES** por su tiempo, por su apoyo y por sus valiosas contribuciones y por hacerme una mejor profesional. Por hacerme ver lo diferente que puede ser la realidad con diferentes miradas.

A la **DRA. DORA TREJO AGUILAR**, por creer en mi trabajo y por su valiosa amistad. Su confianza en mi persona en varias ocasiones supero la que yo misma llegue a tenerme. Por ser digno ejemplo de perseverancia, fortaleza y entereza en momentos tan difíciles.

Al **DR. JESÚS PÉREZ MORENO**, por la colaboración, paciencia, apoyo brindado y sobre todo por esa gran amistad y consejos en los momentos que más lo necesitaba.

Al **M. EN C. CARLOS CASTILLO CABRERA**, por ayudarme a crecer y madurar como persona, por estar conmigo apoyándome durante este agradable y difícil periodo académico. Pero sobre todo porque estuviste cuando más lo necesite.

Al **DR. JUAN JOSÉ ALMARAZ SUÁREZ**, por la sonrisa y mano amiga en los momentos difíciles y los alegres, y por brindarme la oportunidad de contar con su amistad incondicional.

Al **DR. DANIEL GONZÁLEZ MENDOZA**, que estuvo conmigo y compartió tantas experiencias, desveladas y triunfos. Gracias por hacer mi estancia en el CP más amena.

Al **PERSONAL TÉCNICO, ACADÉMICO Y ESTUDIANTES DEL ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEL SUELO**, Rosario, Edmundo, Fernando, Lorenzo, María Encarnación, Alicia, Julián, Eric, Rosalba, Claudia, Carlitos, Adán, Ángeles, Esmeralda, Magdalena, Katina, Mariano, Elisa, Armando y Leonardo.

Por último quiero manifestar mi agradecimiento a todos aquellos que me han devuelto una sonrisa, a todos aquellos que me ofrecieron una mano amiga en tiempos difíciles, a todos aquellos que han puesto de su parte para que el trajín diario en el Colegio de Postgraduados fuera más llevadero.

*A todos mi mayor reconocimiento y gratitud*

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	xii
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>CAPÍTULO I</b> .....	5
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	5
<b>1.1 OBJETIVOS</b> .....	7
1.1.1 Objetivo general .....	7
1.1.2 Objetivos particulares .....	7
<b>1.2 HIPÓTESIS</b> .....	8
1.2.1 Hipótesis particulares .....	8
<b>CAPÍTULO II. GENERALIDADES DE LOS ECOSISTEMAS ACUÁTICOS CONTAMINADOS CON ARSÉNICO Y COBRE, Y EL SIMBIOSISTEMA <i>Azolla-Anabaena azollae</i></b> .....	9
<b>RESUMEN</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
2.1 Deterioro y fragilidad de los ecosistemas acuáticos .....	11
2.2 Evaluación de ecosistemas acuáticos .....	11
2.3 Alteración de ecosistemas acuáticos por contaminación .....	12
2.4 Contaminación de sistemas acuáticos por metales pesados y metaloides.....	15
2.5 Límites permisibles de metales pesados y metaloides en cuerpos de agua.....	16
2.5.1 Cobre .....	17
2.5.2 Arsénico .....	18
2.6 Sistemas de destoxificación de aguas contaminadas .....	20
2.7 Generalidades del simbiosistema <i>Azolla-Anabaena azollae</i> .....	22
2.8 Biotecnologías dirigidas a la destoxificación de aguas contaminadas .....	26
2.9 El simbiosistema <i>Azolla-Anabaena azollae</i> en la destoxificación del agua contaminada con metales pesados o metaloides .....	27

<b>CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DIEZ COLECTAS DEL GÉNERO <i>Azolla</i></b> .....	30
<b>RESUMEN</b> .....	30
<b>ABSTRACT</b> .....	31
<b>3.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	32
<b>3.2 OBJETIVO</b> .....	33
<b>3.3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	33
3.3.1 Condiciones de crecimiento de <i>Azolla</i> .....	33
3.3.2 Amplificación, clonación y secuenciación del ADN de <i>Azolla</i> .....	34
<b>3.4 RESULTADOS</b> .....	34
3.4.1 Identificación taxonómica de colectas de <i>Azolla</i> .....	34
<b>3.5 DISCUSIÓN</b> .....	39
<b>3.6 CONCLUSIONES</b> .....	43
<b>CAPÍTULO IV. EFECTO TÓXICO DEL ARSENATO EN EL CONTENIDO DE CLOROFILA, CAROTENOIDES Y COMPUESTOS FENÓLICOS DE <i>Azolla filiculoides</i></b> .....	44
<b>RESUMEN</b> .....	44
<b>ABSTRACT</b> .....	45
<b>4.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	46
<b>4.2 OBJETIVO</b> .....	47
<b>4.3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	48
4.3.1 Material biológico y establecimiento del experimento .....	48
4.3.2 Crecimiento, y pigmentos fotosintéticos .....	48
4.3.3 Actividad antioxidante total y compuestos fenólicos totales .....	49
4.3.4 Acumulación de arsénico en frondas de <i>Azolla</i> .....	49
4.3.5 Análisis estadístico .....	50
<b>4.4 RESULTADOS</b> .....	50
4.4.1 Afectación del crecimiento y pigmentos fotosintéticos de <i>Azolla</i> por exposición a arsénico .....	50
4.4.2 Respuesta de <i>Azolla</i> en la actividad antioxidante total y compuestos fenólicos totales por exposición a arsénico .....	52

4.4.3 Acumulación de arsénico en frondas de <i>Azolla</i> .....	54
<b>4.5 DISCUSIÓN</b> .....	55
<b>4.6 CONCLUSIONES</b> .....	57
<b>CAPÍTULO V. INFLUENCIA DE LA ACUMULACIÓN DE ARSÉNICO EN LAS CONCENTRACIONES ELEMENTALES DE <i>Azolla filiculoides</i></b> .....	58
<b>RESUMEN</b> .....	58
<b>ABSTRACT</b> .....	59
<b>5.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	60
<b>5.2 OBJETIVO</b> .....	61
<b>5.3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	61
5.3.1 Material biológico y establecimiento del experimento .....	61
5.3.2 Determinación de la tasa relativa de crecimiento y tasa de duplicación .....	62
5.3.3 Determinación del factor de bioacumulación y factor de bioabsorción de arsénico y elementos químicos .....	62
5.3.4 Análisis de elementos químicos en frondas de <i>Azolla</i> .....	62
5.3.5 Análisis estadístico .....	64
<b>5.4 RESULTADOS</b> .....	65
5.4.1 Tasa relativa de crecimiento y tasa de duplicación de <i>Azolla         filiculoides</i> .....	65
5.4.2 Capacidad de bioacumulación y bioabsorción de As y otros elementos químicos en frondas de <i>Azolla filiculoides</i> .....	66
5.4.3 Efecto de arsénico en la absorción de fósforo .....	67
5.4.4 Influencia del arsénico en la concentración de otros elementos .....	68
<b>5.5 DISCUSIÓN</b> .....	72
<b>5.6 CONCLUSIONES</b> .....	79
<b>CAPÍTULO VI. EFECTO DEL COBRE EN LA FLUORESCENCIA DE CLOROFILA Y PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA DE <i>Azolla filiculoides</i> Y <i>Azolla caroliniana</i></b> .....	80

<b>RESUMEN</b> .....	80
<b>ABSTRACT</b> .....	81
<b>6.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	82
<b>6.2 OBJETIVO</b> .....	83
<b>6.3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	83
6.3.1 Material biológico y condiciones experimentales.....	83
6.3.2 Estimación de la permeabilidad de la membrana (fuga de electrolitos).....	84
6.3.3 Fluorescencia de clorofila.....	84
6.3.4 Determinación de compuestos fenólicos.....	84
6.3.5 Análisis estadístico.....	85
<b>6.4 RESULTADOS</b> .....	85
6.4.1 Permeabilidad de la membrana de <i>Azolla</i> .....	85
6.4.2 Compuestos fenólicos totales.....	86
6.4.3 Fluorescencia de clorofila.....	88
<b>6.5 DISCUSIÓN</b> .....	89
<b>6.6 CONCLUSIONES</b> .....	91
<b>CAPÍTULO VII. ACUMULACIÓN DE COBRE Y SU IMPACTO EN     LOS CONTENIDOS ELEMENTALES EN FRONDAS DE <i>Azolla     filiculoides</i> Y <i>Azolla caroliniana</i></b> .....	92
<b>RESUMEN</b> .....	92
<b>ABSTRACT</b> .....	93
<b>7.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	94
<b>7.2 OBJETIVO</b> .....	95
<b>7.3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	95
7.3.1 Material biológico y establecimiento del experimento.....	95
7.3.2 Estimulación/inhibición en crecimiento.....	96
7.3.3 Factor de bioacumulación y bioabsorción.....	96
7.3.4 Preparación de muestras para análisis en XRF.....	96
7.3.5 Análisis estadístico.....	96
<b>7.4 RESULTADOS</b> .....	97



LITERATURA CITADA .....	137
ANEXOS .....	149

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> Tecnologías más utilizadas en la separación de metales pesados y otros contaminantes a partir de aguas contaminadas .....	22
<b>Figura 2.2</b> <i>Azolla</i> sp (A), contiene en la cavidades de sus frondas (B) colonias de cianobacterias filamentosas de <i>Anabaena azollae</i> (C), con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. La fijación de nitrógeno se produce en los heterocistos .....	23
<b>Figura 2.3</b> Morfología de <i>Azolla</i> y esporocarpos .....	25
<b>Figura 3.1</b> Clasificación taxonómica de los diez helechos de <i>Azolla</i> que integran el <i>Azollatum</i> “Alfredo Echegaray Alemán”, Área de Microbiología del Suelo, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo .....	35
<b>Figura 4.1</b> A) Biomasa seca total, y B) estimulación/inhibición en crecimiento de <i>Azolla filiculoides</i> después de 96 h de exposición a diferentes concentraciones de arsenato de sodio en la solución nutritiva .....	51
<b>Figura 4.2</b> Contenido de pigmentos fotosintéticos de <i>Azolla filiculoides</i> , después de 96 h de exposición a arsénico.....	52
<b>Figura 4.3</b> Actividad de antioxidante totales (A), y contenido de fenólicos totales (B) de <i>Azolla filiculoides</i> expuesto a diferentes concentraciones de arsenato de sodio en la solución nutritiva, después de 96 h .....	53
<b>Figura 4.4</b> Acumulación de arsénico en frondas de <i>Azolla filiculoides</i> después de 96 h de exposición a concentraciones crecientes de	

	arsénico en la solución nutritiva .....	54
<b>Figura 5.1</b>	Análisis de frondas de <i>Azolla filiculoides</i> mediante fluorescencia de rayos-X por dispersión de energía .....	63
<b>Figura 5.2</b>	Tasa relativa de crecimiento y tasa de duplicación de <i>Azolla filiculoides</i> después de 96 h de exposición a arsénico .....	65
<b>Figura 5.3</b>	Concentración de arsénico y fósforo en <i>Azolla filiculoides</i> , después de 96 h de exposición a diferentes concentraciones de arsénico .....	67
<b>Figura 5.4</b>	Relación en concentración de arsénico y fósforo en <i>Azolla filiculoides</i> , después de 96 h de exposición a diferentes concentraciones de arsenato de sodio en la solución nutritiva .....	68
<b>Figura 5.5</b>	Espectros de frondas de <i>Azolla filiculoides</i> expuesta a concentraciones crecientes de arsénico en la solución nutritiva, obtenidos mediante fluorescencia de rayos-X con apoyo de SANDRA.....	69
<b>Figura 5.6</b>	Concentración elemental de frondas de <i>Azolla filiculoides</i> expuesta a concentraciones crecientes de arsénico en la solución nutritiva .....	71
<b>Figura 6.1</b>	Porcentaje de fuga de electrolitos medido en frondas de tres colectas de <i>Azolla</i> expuestas a 0.02, 0.2, 1, 2 mM Cu <sup>+2</sup> .....	86
<b>Figura 6.2</b>	Compuestos fenólicos solubles totales en tres colectas de <i>Azolla</i> expuestas a 0.02, 0.2, 1, 2 mM Cu <sup>+2</sup> durante 36 h .....	87
<b>Figura 6.3</b>	Respuesta del fotosistema II de tres colectas de frondas de <i>Azolla</i> expuestas a concentraciones crecientes de Cu <sup>2+</sup> durante 36 h. ....	88

<b>Figura 7.1</b>	Porcentaje de estimulación/inhibición del crecimiento de <i>Azolla filiculoides</i> y <i>Azolla caroliniana</i> después de 36 h de exposición a concentraciones crecientes de Cu en la solución nutritiva .....	97
<b>Figura 7.2</b>	Acumulación de Cu en frondas de dos especies de <i>Azolla</i> después de 36 h de exposición a concentraciones crecientes del metal en la solución nutritiva .....	98
<b>Figura 7.3</b>	Contenido de P, Al, Zn, Mn, Cl y Cu en frondas de <i>Azolla filiculoides</i> después de 36 h de exposición a concentraciones crecientes de Cu.....	101
<b>Figura 7.4</b>	Contenido de S, Fe, Ca, K y Cu en <i>Azolla filiculoides</i> después de 36 h de exposición a concentraciones crecientes de Cu .....	102
<b>Figura 7.5</b>	Contenido de fósforo, aluminio, zinc, manganeso, cloro y cobre en frondas de <i>Azolla caroliniana</i> después de 36 h de exposición a concentraciones crecientes de Cu .....	104
<b>Figura 7.6</b>	Contenido de S, Fe, Ca, K y Cu en frondas de <i>Azolla caroliniana</i> después de 36 h de exposición a concentraciones crecientes de Cu .....	105
<b>Figura 8.1</b>	Fronδας de <i>Azolla</i> . A) frondas basales seleccionadas (flechas) para la obtención de cortes (Barra=5 mm) y; B) área de corte en fronda basal (Barra=0.5 mm).....	116
<b>Figura 8.2</b>	Efecto del arsénico en la morfo-estructura de <i>Azolla filiculoides</i> expuesta a concentraciones crecientes del metaloide, durante 96 h.....	119
<b>Figura 8.3</b>	Cambios estructurales de las células auxiliares de la cianobacteria <i>Anabaena azollae</i> , después de 96 h de exposición a concentraciones crecientes de arsénico .....	121

<b>Figura 8.4</b>	Efecto de concentraciones crecientes de cobre en la morfo- estructura de <i>Azolla filiculoides</i> .....	124
-------------------	--	-----

<b>Figura 8.5</b>	Efecto de concentraciones creciente de cobre en la morfo- estructura de <i>Azolla caroliniana</i> .....	126
-------------------	--	-----

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 2.1</b>	Parámetros para calcular el índice de calidad del agua .....	12
-------------------	--	----

<b>Cuadro 2.2</b>	Substancias contaminantes de industrias que deterioran los ecosistemas acuáticos.....	13
-------------------	--	----

<b>Cuadro 2.3</b>	Límites permisibles de metales y metaloides en alimentos, agua potable y agua purificada en México .....	16
-------------------	---	----

<b>Cuadro 2.4</b>	Ajuste de cumplimiento gradual anual de límite permisible de arsénico en México.....	17
-------------------	---	----

<b>Cuadro 2.5</b>	Composición química de <i>Azolla</i> en base a su peso seco .....	26
-------------------	---	----

<b>Cuadro 2.6</b>	Elementos metálicos removidos por <i>Azolla-Anabaena</i> a partir de aguas contaminadas.....	29
-------------------	---	----

<b>Cuadro 3.1</b>	Colectas de <i>Azolla</i> que integran el <i>Azollatum</i> “Alfredo Echegaray Alemán”, Área de Microbiología del Suelo, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo .....	33
-------------------	---	----

<b>Cuadro 3.2</b>	Identificación taxonómica de colectas de <i>Azolla</i> que integran el <i>Azollatum</i> “Alfredo Echegaray Alemán”, Área de Microbiología del Suelo, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo .....	35
-------------------	---	----

<b>Cuadro 5.1</b>	Factor de bioacumulación (FBC) de arsénico y factor de bioabsorción (FBA) de nueve elementos en frondas de <i>Azolla</i> <i>filiculoides</i> expuesta a concentraciones crecientes de arsénico .....	66
-------------------	--	----

<b>Cuadro 5.2</b> Coeficientes de correlación de Pearson ( $r^2$ ) de arsénico y de fósforo con otros elementos en frondas de <i>Azolla filiculoides</i> expuestas durante 96 h arsenato de sodio en la solución nutritiva .....	72
<b>Cuadro 7.1</b> Factor de bioconcentración (FBC) de Cu en dos especies de <i>Azolla</i> después de exponerlos durante 36 h a concentraciones crecientes de Cu.....	99
<b>Cuadro 7.2</b> Factor de bioabsorción (FBA) de elementos químicos en frondas de <i>Azolla filiculoides</i> expuesta 36 h a concentraciones crecientes de Cu en la solución nutritiva. ....	100
<b>Cuadro 7.3</b> Factor de bioabsorción (FBA) de nueve elementos químicos en frondas de <i>Azolla caroliniana</i> expuesta a concentraciones crecientes de Cu en la solución nutritiva, durante 36 h .....	103
<b>Cuadro 8.1</b> Número de plastidios y estructura celular en corte transversal de frondas de <i>Azolla filiculoides</i> expuesta a concentraciones crecientes de arsénico en la solución nutritiva, durante 96 h.	120
<b>Cuadro 8.2</b> Modificación en tamaño de células auxiliares y heterocistos de la cianobacteria <i>Anabaena azollae</i> , expuesta durante 96 h a diferentes concentraciones de arsénico .....	122
<b>Cuadro 8.3</b> Número de plastidios por célula y estructura de las células en corte transversal de frondas de <i>Azolla filiculoides</i> expuesta a cobre en la solución nutritiva, durante 36 h. ....	123
<b>Cuadro 8.4</b> Número de plastidios por célula y estructura de las células en corte transversal de frondas de <i>Azolla caroliniana</i> expuesta a cobre en la solución nutritiva, durante 36 h. ....	127

# MECANISMOS DE TOLERANCIA DEL SIMBIOSISTEMA *Azolla-Anabaena azollae*

## ANTE ARSÉNICO Y COBRE

Gabriela Sánchez-Viveros, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2012

### RESUMEN

Esta investigación evaluó algunos mecanismos de tolerancia del simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae* ante agua contaminada con arsénico ( $\text{As}^{+5}$ ) y/o cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Para lo anterior, se plantearon seis fases experimentales: 1) identificar molecularmente a nivel de especie a diez colectas de *Azolla*, 2) evaluar la capacidad de acumulación de  $\text{As}^{+5}$  y los efectos tóxicos del metaloide en el simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae*, 3) determinar la influencia del  $\text{As}^{+5}$  en la concentración de nueve elementos en las frondas de *Azolla filiculoides*, 4) evaluar el efecto del  $\text{Cu}^{2+}$  sobre la actividad fotosintética y permeabilidad de la membrana de *Azolla filiculoides* y *Azolla caroliniana*, 5) comparar la capacidad de acumulación de  $\text{Cu}^{2+}$  en dos especies de *Azolla* y, 6) conocer las modificaciones morfoestructurales en dos especies de *Azolla* por efecto del  $\text{As}^{+5}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ .

Como principales resultados se tienen los siguientes: 1) De las diez colectas de *Azolla*, seis pertenecen a *A. filiculoides*, una a *A. rubra*, una a *A. mexicana*, y dos a *A. microphylla* x *A. filiculoides*. 2) Las concentraciones crecientes de  $\text{As}^{+5}$  disminuyeron la tasa relativa de crecimiento, la tasa de duplicación, el factor de bioacumulación, el contenido de clorofila, la actividad total de antioxidantes, los compuestos fenólicos totales, y aumentó el contenido de carotenoides totales + xantofilas en *A. filiculoides*; en este helecho la máxima acumulación de  $\text{As}^{+5}$  fue  $28 \mu\text{g g}^{-1}$ . 3) La técnica de fluorescencia de rayos-X mostró que el  $\text{As}^{+5}$  en altas concentraciones tuvo un impacto negativo en la asimilación de S, K, Mn, Fe y Zn. 4) *Azolla*

*filiculoides* a bajas concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$  mostró mayor crecimiento que *Azolla caroliniana*, aunque este metal en altas concentraciones inhibió el crecimiento, afectó el fotosistema II, y aumentó la permeabilidad de la membrana. 5) El  $\text{Cu}^{2+}$  tuvo un impacto negativo en la concentración de S, Cl, K, Al, P, Zn, Mn, Fe y Ca de ambas especies de *Azolla*. 6) El incremento en la concentración de  $\text{As}^{+5}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  indujo cambios morfo-estructurales en las frondas de *Azolla*, asociados a la disminución del número de plastidios, desorganización celular, atrofia parda y necrosada, lisis de células epidérmicas y deshidratación de los primordios foliares de las frondas. El  $\text{As}^{+5}$  y el  $\text{Cu}^{2+}$  tuvieron un efecto negativo sobre la cianobacteria *Anabaena azollae* que mostró cadenas de células más cortas y separación de heterocistos.

Estos resultados son de las primeras evidencias sobre la influencia del  $\text{As}^{+5}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  en dos especies de *Azolla* de México. Una aportación metodológica de este trabajo fue el uso de la técnica de fluorescencia de rayos-X para medir con una alta sensibilidad las concentraciones elementales sin destruir las frondas. Independientemente de las diferencias en la bioacumulación de  $\text{As}^{+5}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  en *A. filiculoides* y *A. caroliniana*, éstas pueden crecer en aguas contaminadas con estos elementos. Sin embargo, *A. caroliniana* tiene mayores posibilidades de sobrevivir ante altas concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$  (2 mM).

**Palabras clave:** Contaminación, fitorremediación, helechos, metales pesados, metaloides.

**MECHANISMS OF TOLERANCE OF THE *Azolla-Anabaena azollae*  
SYMBIOSYSTEM TO ARSENIC AND COPPER**

Gabriela Sánchez-Viveros, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2012

**ABSTRACT**

This research evaluated few mechanisms of tolerance of the *Azolla-Anabaena azollae* symbiosystem under contaminated water with arsenic ( $\text{As}^{+5}$ ) and/or copper ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Thus, six experimental stages were performed: 1) To identify molecularly the species of ten collects of *Azolla*, 2) To evaluate the accumulation of  $\text{As}^{+5}$  and its toxic effects on the *Azolla-Anabaena azollae* symbiosystem, 3) To determine the influence of  $\text{As}^{+5}$  on the concentration of nine elements in the fronds of *A. filiculoides*, 4) To evaluate the effect of  $\text{Cu}^{2+}$  on the photosynthetic activity and membrane permeability of *A. filiculoides* and *A. caroliniana*, 5) To compare the accumulation of  $\text{Cu}^{2+}$  in two species of *Azolla* and, 6) To know the morpho-structural modifications of two species of *Azolla* due to  $\text{As}^{+5}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  exposure.

As main results: 1) From the ten collects of *Azolla*, six belonged to *A. filiculoides*, one to *A. rubra*, one to *A. mexicana*, and two to *A. microphylla* x *A. filiculoides*. 2) The increased concentrations of  $\text{As}^{+5}$  diminished the relative growth rate, the duplication rate, the bioaccumulation factor, the chlorophyll content, the total antioxidant activity, the total phenolic compounds, but increased the total content of carotenoids and xanthophylls in *A. filiculoides*; in this fern the maximum accumulation of  $\text{As}^{+5}$  was  $28 \mu\text{g g}^{-1}$ . 3) The X-ray fluorescence technique showed that high concentrations of  $\text{As}^{+5}$  had a negative impact on the assimilation of S, K, Mn, Fe and Zn. 4) *Azolla filiculoides* under low concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  had greater growth than *A. caroliniana*, although this metal at high concentrations inhibited

the growth, impaired the photosystem II, and increased the membrane permeability. 5) The  $\text{Cu}^{2+}$  negatively impacted the concentration of S, Cl, K, Al, P, Zn, Mn, Fe and Ca in both species of *Azolla*. 6) The increase of the  $\text{As}^{+5}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  concentration resulted in morpho-structural changes in fronds of *Azolla* that are associated to diminishing the number of plastids, cellular disorganization, brown and necrotic atrophy, epidermal cell lysis, and dehydration of the leaf primordia of the fronds. The  $\text{As}^{+5}$  and the  $\text{Cu}^{2+}$  had a negative effect on the cyanobacterium *Anabaena azollae* which showed shorter cell chains and detached heterocysts.

These results are the first evidences about the influence of  $\text{As}^{+5}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  in two species of *Azolla* from Mexico. A methodological contribution of this work was the use of the technique of X-ray fluorescence to measure with high sensitivity elemental concentrations without destroying the fronds. Regardless of differences in the bioaccumulation of  $\text{As}^{+5}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  of *A. filiculoides* and *A. caroliniana*, both ferns are able to grow under contaminated water with these two pollutants. Nevertheless, *A. caroliniana* has more possibilities to survive at high concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  (2 mM).

**Key words:** Contamination, ferns, heavy metals metalloids, phytoremediation.

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN GENERAL

La contaminación de los ecosistemas acuáticos del país procede principalmente de las actividades humanas (Aguilar, 2003). El desarrollo y la industrialización suponen un mayor uso de agua, y a la vez, la generación de residuos que son causa de contaminación; así, plaguicidas, desechos químicos, metales pesados, metaloides, residuos radiactivos, etc. Se han encontrado en diferentes concentraciones al analizar los ecosistemas acuáticos de México (CNA, 2005). Los ecosistemas acuáticos tienen una gran capacidad de purificación. Pero esta misma facilidad de regeneración del agua, y su aparente abundancia, hace que sea el vertedero habitual en el que se arrojan los residuos producidos por varias actividades industriales.

El arsénico (As) es un contaminante inorgánico ampliamente distribuido en diversos ecosistemas acuáticos, y es altamente tóxico para todas las formas de vida, principalmente en forma de arsenato ( $\text{As}^{5+}$ ) y arsenito ( $\text{As}^{3+}$ ; Rudra *et al.*, 2006). Este metaloide ha sido la causa de epidemias de arsenocosis, cáncer, tumores epidermoides en pulmón por lo que representa uno de los mayores problemas de salud (Mondal, 2006). Por otra parte, la presencia de iones metálicos de transición, como ión cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) genera problemas de contaminación. El Cu está presente en los efluentes de diversas industrias con efectos nocivos sobre la salud y la calidad del agua. Además de la gran preocupación ambiental, las concentraciones elevadas del Cu son tóxicas para los organismos (Ahmad *et al.*, 2008; Rauf *et al.*, 2009). Estudios previos sobre la capacidad de adsorción, la distribución geoquímica de los contaminantes y la asociación química del Cu o el As han demostrado la existencia de contaminación por este metal y metaloide en diversas áreas de México (Khalil *et al.*, 2006; Shumilin *et al.*, 2000).

Diferentes propuestas tecnológicas han sido planteadas para corregir la contaminación de los ecosistemas acuáticos (Navarro *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2005). Entre las más

innovadoras resalta la fitorremediación (Garbisu *et al.*, 2002), que comprende el uso de plantas para contener, eliminar o neutralizar compuestos orgánicos (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006), metales pesados (González-Mendoza *et al.*, 2007) o radionucleidos (Mkandawire *et al.*, 2004) que pueden ser tóxicos en suelos o aguas. La fitorremediación incluye cualquier proceso biológico, químico o físico inducido por las plantas que promueve la absorción, acumulación y metabolismo de los contaminantes, ya sea por las mismas plantas o por microorganismos asociados (Salt *et al.*, 1995). Uno de los sistemas simbióticos con potencial de uso en la fitorremediación de ecosistemas acuáticos, es la simbiosis entre el helecho acuático *Azolla* spp y las cianobacterias *Anabaena azollae* o *Nostoc* sp. Esta simbiosis representa excelente potencial de uso en la destoxificación de ecosistemas acuáticos con problemas de acumulación de metales pesados, metaloides, plaguicidas, y en la destoxificación por hidrocarburos.

La efectividad del simbiosistema *Azolla-Anabaena* para acumular metales pesados y metaloides en solución, muestra que este helecho puede ser una alternativa biotecnológica para la limpieza de aguas contaminadas. No obstante, es necesario el desarrollo de investigaciones que consideren la identificación, la selección y la evaluación de biotipos con alta capacidad de acumulación de metales pesados o metaloides, crecimiento y desarrollo rápido en condiciones adversas, además de un mayor entendimiento de los mecanismos de tolerancia a metales pesados y metaloides para la aplicación del simbiosistema.

Por lo tanto, resulta de interés identificar molecularmente a nivel de género y especie diferentes colectas del simbiosistema *Azolla-Anabaena* nativas de México, conocer la respuesta a la toxicidad de  $As^{5+}$  y  $Cu^{2+}$ , la influencia del metaloide y el metal sobre la absorción de otros elementos y, las modificaciones morfo-estructurales del simbiosistema en un sistema contaminado artificialmente con arsénico y cobre, que permitan discernir algunos

de los posibles mecanismos de tolerancia y acumulación de estos elementos de *Azolla*, que le permiten crecer y sobrevivir en aguas contaminadas con estos compuestos inorgánicos.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo general

Evaluar los mecanismos de tolerancia a arsénico y cobre del simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae* que le permite crecer y sobrevivir en aguas contaminadas con el metaloide y el metal pesado.

### 1.1.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar molecularmente a nivel de género y especie diez colectas de *Azolla* provenientes de diferentes zonas geográficas en México, mediante la técnica de PCR.
2. Evaluar la capacidad de acumulación de arsénico en *Azolla filiculoides*, y el efecto tóxico del metaloide sobre el crecimiento, los pigmentos fotosintéticos y la fisiología del helecho.
3. Evaluar la acumulación de arsénico y determinar su posible relación con la asimilación de fósforo y otros elementos esenciales en *Azolla filiculoides*, mediante la técnica de fluorescencia de rayos-X por dispersión de energía.
4. Evaluar el efecto tóxico del cobre sobre el fotosistema II, la permeabilidad de la membrana celular, y los compuestos fenólicos totales como posibles indicadores del estrés del cobre en dos especies de *Azolla*.
5. Comparar la capacidad de acumulación de cobre en dos especies de *Azolla*, y determinar el impacto de este metal en el contenido de otros elementos químicos esenciales en las frondas de los dos helechos.

6. Evaluar las modificaciones morfo-estructurales del simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae* por exposición a arsénico y cobre.

## 1.2 HIPÓTESIS

El simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae* presenta mecanismos fisiológicos activos de tolerancia ante arsénico y cobre para contrarrestar los posibles efectos negativos en la fisiología del helecho, lo que le permite crecer y sobrevivir en aguas contaminadas con el metaloide y el metal pesado.

### 1.2.1 Hipótesis particulares

1. La técnica de PCR permite identificar taxonómicamente con certeza mayor al 90% a nivel de género y especie colectas de *Azolla*.
2. El helecho *Azolla filiculoides* presenta el mecanismo de acumulación de arsénico en sus frondas, además de tener la capacidad de crecer y minimizar el efecto tóxico del metaloide sobre su fisiología.
3. La acumulación de arsenato en *Azolla filiculoides* tiene un impacto negativo en la asimilación de fosfato y otros elementos esenciales en las frondas del helecho.
4. El fotosistema II, la permeabilidad de la membrana celular, y los compuestos fenólicos totales son indicadores del estrés por cobre en *Azolla*.
5. La acumulación de cobre en las frondas de *Azolla filiculoides* tiene un impacto negativo menor en la concentración de elementos químicos esenciales en comparación con *Azolla caroliniana*.
6. El helecho *Azolla caroliniana* y su cianobionte *Anabaena Azollae* presentan menores modificaciones morfo-estructurales como mecanismos de adaptación ante la exposición a arsénico y cobre que el helecho *Azolla filiculoides* y su cianobionte *Anabaena azollae*.

## CAPÍTULO II

### GENERALIDADES DE LOS ECOSISTEMAS ACUÁTICOS CONTAMINADOS CON ARSÉNICO Y COBRE, Y EL SIMBIOSISTEMA *Azolla-Anabaena azollae*

#### RESUMEN

El deterioro de los ecosistemas acuáticos se debe a la contaminación generada por las actividades humanas; esto ha demandado el desarrollo de tecnologías que permitan medir el grado de contaminación y el proceso de destoxificación de los sistemas contaminados. *Azolla* es un helecho acuático que vive en la superficie de cuerpos de agua, el cual tiene como cianobionte a *Anabaena azollae*; juntos constituyen una de las simbiosis más eficientes en la fijación biológica del nitrógeno atmosférico. Algunas especies de *Azolla* son capaces de crecer y sobrevivir en condiciones de contaminación por metaloides y metales pesados; sin embargo, los estudios sobre sus mecanismos de tolerancia hacia estos contaminantes han sido escasamente estudiados. La presente revisión recopila información disponible, respecto a las fuentes y la presencia de contaminantes inorgánicos en los ecosistemas acuáticos con énfasis en arsénico y cobre, con el fin de conocer el potencial del simbiosistema *Azolla-Anabaena* como una biotecnología para destoxificar ecosistemas acuáticos contaminados con metaloides o metales pesados. Para tales fines, es necesario realizar investigaciones enfocadas en caracterizar especies de *Azolla* de México y evaluar sus mecanismos de tolerancia y acumulación de arsénico y cobre, y definir con ello su posible aplicación como biotecnología de limpieza de cuerpos de agua contaminados con arsénico y cobre.

**Palabras clave:** *Ecosistemas acuáticos, fitorremediación, helecho, metal pesado, metaloide.*

**CHAPTER II**  
**GENERALITIES OF AQUATIC ECOSYSTEMS CONTAMINATED BY ARSENIC**  
**AND COPPER, AND THE SYMBIOSYSTEM *Azolla-Anabaena azollae***

**ABSTRACT**

The deterioration of aquatic ecosystems is due to contamination provoked by human activities; thus, the development of specific technologies that allow the measurement of the contamination levels and the detoxification process in the contaminated systems is highly necessary. *Azolla* is an aquatic fern that lives on the surface of water bodies, and hosts the cyanobiont *Anabaena azollae*, together represent one of the most efficient symbioses for fixing the atmospheric nitrogen. Some *Azolla* species are able to grow and survive under contaminated environments with metalloids and heavy metals; however, the studies focused on their mechanisms of tolerance to those pollutants have been scarcely investigated. This review compiles available information about the sources and the presence of inorganic pollutants in aquatic ecosystems with emphasis on arsenic and copper, to know the potential of the *Azolla-Anabaena* symbiosystem as biotechnology for detoxifying aquatic ecosystems contaminated with metalloids or heavy metals. For this purpose is still necessary to perform research focused on characterizing *Azolla* species from Mexico, to evaluate their mechanisms to tolerate and accumulate arsenic or copper, and thus, to define their possible application as a biotechnological tool for cleaning contaminated water bodies with arsenic or copper.

**Key words:** *Aquatic ecosystems, fern, heavy metals, metalloid, phytoremediation.*

## **2.1 DETERIORO Y FRAGILIDAD DE LOS ECOSISTEMAS ACUÁTICOS**

Los ecosistemas acuáticos realmente no son un sistema cerrado, es claro que sus límites volumétricos le permiten solamente una cierta capacidad de dilución y degradación de contaminantes. Excedida esta capacidad, todo ecosistema acuático empezará a deteriorarse, y luego de un período de aparente resistencia a la contaminación se destruirá (Aguilar, 2003). Lo que resulta especialmente frágil en los ecosistemas acuáticos es su biodiversidad, pues la biota local ha evolucionado durante miles (o millones) de años conformando comunidades ecológicas únicas (Olguin, 2005). La fragilidad de los ecosistemas acuáticos tiene, implicaciones de fragilidad social al disminuir el acceso al agua en calidad, cantidad y certeza de su existencia en el futuro.

Con base en la demanda bioquímica de oxígeno, la Comisión Nacional del Agua (CNA) de México, señala que hasta el 2006, el agua tenía la siguiente clasificación: 5% de excelente calidad, 22% de calidad aceptable, 49% poco contaminada, 15% contaminada, 7% altamente contaminada y 2% con presencia de tóxicos. De forma extraoficial, la CNA reconoce que el 70% de la contaminación de los cuerpos de agua en México se produce por la agricultura, la deforestación y un mal manejo de la basura (Aguilar, 2003; Aguilar y Pérez, 2008).

## **2.2 EVALUACIÓN DE ECOSISTEMAS ACUÁTICOS**

El creciente deterioro de los ecosistemas acuáticos ha demandado el desarrollo de sistemas y métodos que permitan conocer su grado de alteración debido a causas naturales y antropogénicas (Arroyave, 2004). Las técnicas desarrolladas para evaluar el nivel de contaminación de cuerpos de agua permiten: a) caracterizar la existencia y severidad de daños en los recursos acuáticos; b) ayudar a identificar las fuentes y las causas de los daños; c) evaluar la efectividad de las acciones de control de la contaminación y la restauración de

ambientes acuáticos; d) validar estudios accesibles y acumular valoraciones de impacto y, e) caracterizar los atributos de los ecosistemas en conservación (Celis *et al.*, 2005).

México cuenta con un método estandarizado para medir la calidad del agua, denominado índice de calidad del agua (ICA), el cual se calcula con base en 18 parámetros, seleccionados por su importancia relativa para reconocer el grado de contaminación (Cuadro 2.1). El ICA establece el grado de contaminación del agua a la fecha del muestreo y está expresado como porcentaje de agua pura. El agua altamente contaminada tendrá un ICA igual o cercano a 0%, en tanto que en el agua en excelentes condiciones el valor del índice será cercano a 100% (SEMARNAT, 2008).

**Cuadro 2.1.** Parámetros para calcular el índice de calidad del agua (ICA; SEMARNAT, 2008).

Parámetro	%*	Parámetro	%*
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)	5	Nitrógeno en nitratos	2
Oxígeno disuelto	5	Alcalinidad	1
Coliformes fecales	4	Color	1
Coliformes totales	3	Dureza total	1
Sustancias activas al azul de metileno (detergentes)	3	Potencial de hidrógeno (pH)	1
Conductividad eléctrica	2	Sólidos suspendidos	1
Fosfatos totales (PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	2	Cloruros	0.5
Grasas y aceites	2	Sólidos disueltos	0.5
Nitrógeno amoniacal (NH <sub>3</sub> )	2	Turbidez	0.5

\*Escala de calificación individual máxima por parámetro. La suma de los 18 parámetros indica la calidad del agua en escala de 0 a 100, mayor valor mejor calidad.

Para mayor información sobre cómo calcular el ICA, se recomienda consultar la página web de la CNA ([www.cna.gob.mx](http://www.cna.gob.mx)).

### 2.3 ALTERACIÓN DE ECOSISTEMAS ACUÁTICOS POR CONTAMINACIÓN

La estabilidad de los ecosistemas acuáticos puede ser modificada por la presencia de contaminantes, que pueden proceder de fuentes naturales o de actividades humanas (Yúnez y Rojas, 2007), de las que sin duda la más importante, es la provocada por el hombre.

Normalmente las fuentes de contaminación natural son muy dispersas y no provocan alteraciones significativas del agua. En cambio, la alteración de los ecosistemas acuáticos por contaminación de origen humano, se concentra en zonas específicas y, es mucho más peligrosa. Los contaminantes de ecosistemas acuáticos se pueden clasificar como: contaminantes que alteran el medio físico, y contaminantes tóxicos (Cuadro 2.2). Los primeros no afectan directamente a los organismos, pero alteran de tal manera el entorno que crean condiciones desfavorables para la vida. Los contaminantes tóxicos por el contrario, afectan directamente a los organismos, y su toxicidad depende de la concentración, la forma química y la persistencia (SEMARNAT, 2008).

**Cuadro 2.2.** Sustancias contaminantes de industrias que deterioran los ecosistemas acuáticos (SEMARNAT, 2008).

Sector industrial	Sustancias contaminantes
Construcción	Sólidos en suspensión, metales, pH.
Minería	Sólidos en suspensión, metales pesados, materia orgánica, pH, HCN.
Energía	Calor, hidrocarburos y productos químicos.
Textil y piel	Cr, taninos, tensoactivos, H <sub>2</sub> S, colorantes, grasas, disolventes orgánicos, sólidos en suspensión.
Automotriz	Aceites lubricantes, pinturas y aguas residuales.
Navales	Petróleo, productos químicos, disolventes y pigmentos.
Siderurgia	Cascarillas, aceites, metales disueltos, emulsiones, sosas y ácidos.
Química inorgánica	Hg, P, HCN, NH <sub>3</sub> , NO <sup>2-</sup> , H <sub>2</sub> S, F, Mn, Mo, Pb, Ag, Se, Zn y sus compuestos.
Química orgánica	Organohalogenados, organosilícicos, compuestos cancerígenos y otros que afectan al balance de oxígeno.
Fertilizantes	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> y H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Pasta y papel	Sólidos en suspensión y otros que afectan al balance de oxígeno
Plaguicidas	Organohalogenados, organofosforados, cancerígenos, biocidas, etc.
Fibras químicas	Aceites minerales y otros que afectan al balance de oxígeno.
Pintura, barnices	Compuestos organoestámicos, compuestos de Zn, Cr, Se, Mo, Ti, Sn, Ba, etc.

En general existen cuatro tipos básicos de alteraciones de ecosistemas acuáticos por la contaminación provocada por el hombre (Cortinas y Mosler, 2005):

- **Industrial.** La tipología de los vertidos industriales es muy variada según el tipo de industria. En México, se calcula que el sector industrial de acuerdo a los índices de extracción, consumo y contaminación genera el 82% del total de aguas residuales.

- **Vertidos urbanos.** Los vertidos urbanos, se caracterizan por su contaminación orgánica (fecal), disuelta o suspendida, que se mide en su conjunto por su demanda química de oxígeno (DQO) y su demanda biológica de oxígeno (DBO). Además, el alcantarillado arrastra todo tipo de sustancias: emisiones de los automóviles, sales, ácidos, etc. Su nulo tratamiento o indebido genera graves problemas de contaminación. Las aguas negras están formadas por un 99% de agua y 1% de sólidos en suspensión y solución.

- **Navegación.** No existen datos cuantificables sobre la demanda de agua superficial para la acuicultura. La navegación produce diferentes tipos de contaminación, especialmente con hidrocarburos. Los vertidos de petróleo, provocan importantes daños ecológicos que han reducido el potencial acuícola y provocado la desecación de los cuerpos de agua.

- **Agricultura y ganadería.** El sector agropecuario descarga plaguicidas y restos orgánicos de animales y de plantas que contaminan las aguas de una forma difusa pero muy notable (Yúnez y Rojas, 2007). El sector agropecuario genera 11,100 millones de m<sup>3</sup> de aguas residuales. El principal problema es el purín, mezcla de los excrementos sólidos y líquidos del ganado, las aguas residuales y los restos de comida del ganado y cerdos (Aguilar y Pérez, 2008).

## **2.4 CONTAMINACIÓN DE SISTEMAS ACUÁTICOS POR METALES PESADOS Y METALOIDES**

La corteza terrestre está formada por elementos químicos, de los cuales aproximadamente un 75% son metales, entre los que se encuentran aquellos esenciales e indispensables para completar el ciclo de vida de los organismos, aunque tanto en exceso como en deficiencia, pueden generar problemas de salud (Vullo, 2003; Navarro *et al.*, 2007). Otros elementos metálicos, en cambio, no cumplen alguna función fisiológica en los organismos, y resultan tóxicos a dosis muy bajas (Navarro *et al.*, 2007). La contaminación con metales y metaloides en los ecosistemas acuáticos, son una realidad ineludible (González *et al.*, 2008), siendo principalmente las generadas por las actividades humanas (Volke y Velasco, 2005), como es el caso de la extracción minera, el refinamiento de productos mineros o por la liberación de efluentes industriales y emisiones vehiculares. Adicionalmente, las aguas residuales no tratadas provenientes de minas y fábricas llegan a los ríos, mientras que los desechos contaminan las aguas subterráneas. El abandono de metales tóxicos y metaloides en el ambiente, contamina el suelo y se acumulan en las plantas pudiendo permanecer en el ambiente durante cientos de años (Cortinas y Mosler, 2005; ATDSDR, 2006).

Investigaciones científicas han demostrado las repercusiones negativas de los metales pesados y metaloides en los ecosistemas acuáticos y en la salud del ser humano, cuya exposición está relacionada con retrasos en el desarrollo, varios tipos de cáncer, daños en los riñones, e incluso, con casos de muerte; por lo que merecen ser regulados de forma explícita (Mochizuki *et al.*, 2007).

## 2.5 LÍMITES PERMISIBLES DE METALES PESADOS Y METALOIDES EN CUERPOS DE AGUA

En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 refiere los límites permisibles de concentración total de metaloides y metales en alimentos, agua potable y agua purificada (Cuadro 2.3). Los niveles de referencia de la Norma Oficial Mexicana para arsénico ( $0.05 \text{ mg L}^{-1}$ ) en agua se aplican en forma general en todo el territorio nacional. Esta norma ha sido más estricta cada año y gradualmente se ajusta el límite permisible de As de conformidad con el Diario Oficial de la Federación (2000; Cuadro 2.4). Sin embargo, el límite permisible para As en México aún están por encima de los mencionados por el International Programme on Chemical Safety (IPCS, 2001) y la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2003), donde se recomienda un nivel máximo de ( $0.001\text{-}0.010 \text{ mg L}^{-1}$ ). Por su parte, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos Americanos (USEPA), considera bajar el límite permisible de  $0.02 \text{ mg L}^{-1}$ , y a futuro llegar al límite de  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$ . Así mismo, la NOM 127 SSA1-1994 considera el límite permisible de  $2 \text{ mg de Cu L}^{-1}$  para agua de consumo humano (Cuadro 2.3), el cual es igual al de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su *Guía de la calidad del agua potable* (OMS, 2004), mientras que la USEPA ha establecido un máximo de  $1.3 \text{ mg L}^{-1}$  (USEPA, 2001).

**Cuadro 2.3.** Límites permisibles de metales y metaloides en alimentos, agua potable y agua purificada en México (NOM 127 SSA1-1994, 2000).

Elemento	Límite permisible ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Elemento	Límite permisible ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Cadmio	0.005	Aluminio	0.20
Cloro residual libre	0.2-1.50	Arsénico*	0.05
Cobre	2.00	Bario	0.70

\*Ver Cuadro 2.4

**Cuadro 2.4.** Ajuste de cumplimiento gradual anual de límite permisible de arsénico en México (NOM 127 SSA1-1994, 2000).

Límite permisible (mg L <sup>-1</sup> )	Año
0.045	2001
0.040	2002
0.035	2003
0.030	2004
0.025	2005

### 2.5.1 Cobre

El cobre (Cu) con número atómico de 29, peso atómico de 63.536 y densidad de 8960 kg m<sup>-3</sup>, es considerado un metal de transición, término aplicado a los elementos con alta conductividad eléctrica, ductilidad y maleabilidad (Duque *et al.*, 2007). El Cu es el elemento más utilizado para fabricar cables eléctricos y otros componentes eléctricos y electrónicos. Por otra parte, el Cu es un metal duradero porque se puede reciclar un número casi ilimitado de veces sin que pierda sus propiedades mecánicas (Earnshaw y Greenwood, 1997). El Cu es el tercer metal más utilizado en el mundo, después del Fe y del Al (Smith, 1998). México ocupa el décimo segundo lugar a nivel mundial en la producción de Cu con 334 miles de toneladas (INEGI, 2007). Las actividades mineras pueden provocar la contaminación de ríos y aguas subterráneas con cobre y otros metales durante su explotación, así como por el abandono de minas en la zona. Durante la explotación minera, la adición del cobre y otros metales al agua provocan el color turquesa del agua y de las rocas (OMS, 2004; Ginocchio *et al.*, 2005a).

La absorción de Cu por las células se realiza mediante un proceso metabólico activo (Coca y Rosique, 2000). El Cu posee un importante papel biológico en el proceso de la fotosíntesis al formar parte de la composición de la plastocianina contenida en los

cloroplastos, que participa en la cadena de transferencia de electrones (Coca y Rosique, 2000). Alrededor del 70% del cobre de una planta está presente en los cloroplastos, y también se encuentra en algunas enzimas como la citocromo *c* oxidasa, la lisil oxidasa y la superóxido dismutasa. El  $\text{CuSO}_4$ , es el compuesto de mayor importancia industrial y se emplea como abono y plaguicida en la agricultura, como alguicida en la depuración del agua, y como conservante de la madera (Ginocchio *et al.*, 2005a, 2005b).

A pesar de que el Cu es un elemento necesario para la vida, las concentraciones altas (30 g  $\text{CuSO}_4$ ) pueden ser dañinas en los organismos. En el ser humano la ingestión o la inhalación de niveles altos de Cu puede producir náuseas, vómito, diarrea e irritación de las vías respiratorias; además un exceso de Cu en la sangre puede dañar el hígado y los riñones, e incluso causar la muerte (ICSC, 1994; Lagos, 2005; OMS, 2004).

### **2.5.2 Arsénico**

El arsénico(As) con número atómico de 33, densidad de  $5.73 \text{ gcm}^3$  y un peso atómico de 74.92 g pertenece a los metaloides, término aplicado a los elementos con propiedades intermedias entre los metales y los no metales. En la naturaleza, se encuentra con mayor frecuencia en forma de  $\text{As}_2\text{S}_3$  (Matschullat, 2000). En condiciones ácidas del suelo, el  $\text{As}^{+5}$  es la forma predominante, mientras que el  $\text{As}^{+3}$  predomina en condiciones alcalinas (Rahman y Hasegawa, 2011). En aguas subterráneas, el arsénico se encuentra como ion  $\text{As}^{5+}$  insoluble en agua o como moléculas de  $\text{As}^{3+}$  (Lesikar *et al.*, 2006). La escala de toxicidad del arsénico decrece en el siguiente orden:  $\text{H}_3\text{As}$  (arsina) >  $\text{As}^{+3}$  (arsenito) >  $\text{As}^{+5}$  (arsenato) > compuestos arsenicales y arsénico elemental (Matschullat, 2000).

La demanda de As es limitada, sin embargo, se usa en aleaciones no ferrosas (por ejemplo, para aumentar la dureza de las aleaciones de plomo), y el As de máxima pureza se utiliza en la fabricación de semiconductores como el GaAs (arseniato de galio) y InAs

(arseniato de indio). Con la introducción de los antibióticos, los productos farmacéuticos que contienen As han perdido importancia, aunque, los compuestos de arsénico tienen aplicación como plaguicidas y en la fabricación de pigmentos. A nivel mundial, México ocupa el cuarto lugar en la producción de arsénico con 6.263 toneladas (INEGI, 2007).

Existen tres fuentes principales de contaminación de As en el ambiente: a) fundición de metales (minerales de zinc-plomo y de cobre), b) quemado de carbón, y c) el uso de agroquímicos como los fertilizantes y los plaguicidas (Lepp, 1981). El polvo y los gases emanados de las fundidoras contaminan la atmósfera ( $780 \times 10^8$  g As por año), el suelo ( $460 \times 10^8$  g As por año), y las plantas (Mackenzie *et al.*, 1979). De este modo, los suelos y las aguas superficiales cercanas a fundidoras de cobre o plomo presentan concentraciones de As que oscilan entre los 260-380 mg kg<sup>-1</sup>. Asimismo, a lo largo de México, se encuentran depósitos de desechos mineros y residuos de fundiciones que contienen grandes cantidades de As y otros metales pesados asociados. El As puede ser eliminado del agua por técnicas de purificación de agua, por ejemplo la adsorción por alúmina activa, intercambio iónico y filtración con membranas. El As<sup>+5</sup> se elimina más fácil que el As<sup>+3</sup>, por lo que el As<sup>+3</sup> puede eliminarse tras ser pre-oxidado a As<sup>+5</sup>.

Las concentraciones naturales de arsénico en el suelo son de 0.1 a 40 mg kg<sup>-1</sup>, con una concentración media de 5 a 6 mg kg<sup>-1</sup>. En contraste, la concentración de As en un suelo contaminado oscila entre 3,000 y 5,000 mg kg<sup>-1</sup> (Smedley y Kinniburgh, 2002; Mandal y Suzuki, 2002). En México, la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente en el 2005, estableció en la Norma Oficial Mexicana NOM 127 SSA1-1994 el límite permisible de 0.025 mg As L<sup>-1</sup> en agua para uso y consumo humano (Diario Oficial de la Federación, 2000). Los factores que influyen en la disponibilidad del As son el pH, las condiciones de óxido-reducción (E<sub>h</sub>), la presencia de sustancias orgánicas con capacidad de formar complejos, entre

otros (Mandal y Suzuki, 2002). Por lo anterior, los niveles genéricos de referencia para As pueden ser inferiores o superiores a los valores de fondo naturales en los suelos y en las aguas de México. Esto significa que su aplicación puede resultar en la sub-valoración o sobrevaloración del problema ambiental que pueda representar el As (Mandal y Suzuki, 2002).

## **2.6 SISTEMAS DE DESTOXIFICACIÓN DE AGUAS CONTAMINADAS**

En México se ha puesto cada vez más énfasis en los sistemas de destoxificación de los ecosistemas acuáticos contaminados por residuos municipales e industriales. En este sentido, se aplican sofisticados sistemas de tratamientos que combinan procesos físicos, químicos y biológicos a los efluentes de la industria de la minería y de los centros urbanos, para destoxificar el agua (Perera y Baudot, 2001). Algunas de las tecnologías más utilizadas en la separación de metales pesados y otros contaminantes de los efluentes líquidos, se describen brevemente:

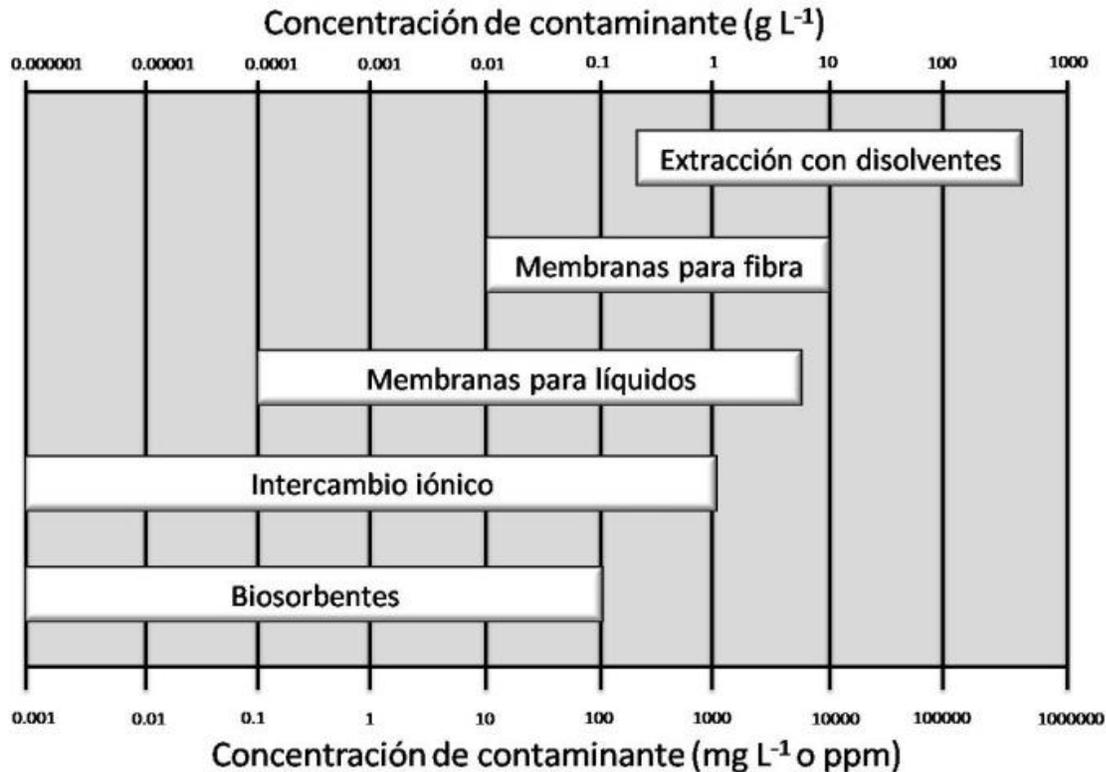
- **Precipitación química:** Este proceso se refiere al tratamiento estándar para eliminar metales disueltos en todo tipo de aguas, y depende principalmente de dos factores: 1) la solubilidad del metal, y 2) la separación del sólido de la disolución acuosa. La precipitación es poco efectiva cuando el metal se encuentra en concentraciones muy bajas (Reynolds, 2002).

- **Recuperación con disolvente:** Este proceso representa una de las tecnologías más utilizadas para la eliminación selectiva de iones metálicos en efluentes industriales, y consiste en poner en contacto un disolvente orgánico con el efluente de agua residual y los iones metálicos se transfieren a la fase orgánica formando un complejo metálico insoluble en agua. Cuando la fase orgánica está en su límite de acumulación metálica se pone en contacto con otra fase acuosa extractante, así los iones metálicos se transfieren a esta nueva disolución y posteriormente por filtración se recuperan los iones metálicos (Perera y Baudot, 2001).

- Tecnología de membrana: En este proceso se aprovecha una diferencia de presión a través de la membrana para superar el gradiente de presión osmótica, a través de la cual sólo pueden difundirse determinadas especies químicas. Bajo estas condiciones los iones no pueden atravesar la membrana y así son separados del disolvente (Reynolds, 2002).

- Intercambio iónico: Es un mecanismo de interacción electrostática que tiene lugar cuando un ión de una disolución se intercambia por otro ión de igual carga eléctrica que se encuentra unido a una partícula sólida inmóvil. El intercambio iónico se requiere cuando las concentraciones de metal en los efluentes son bajas. Dicha tecnología ha tenido aplicaciones a escala comercial para la desmineralización de aguas, teniendo como defecto su falta de selectividad (Perera y Baudot, 2001; Reynolds, 2002).

- Adsorción: El fenómeno de adsorción ocurre de forma natural en sistemas físicos, químicos y biológicos (Nemerow y Dasgupta, 1998). En el proceso de adsorción física las especies metálicas pueden adherirse en varias capas consecutivas y reversibles, dependiendo básicamente del pH, el adsorbente, y la temperatura. La adsorción química es debida a fuerzas de naturaleza química, y este proceso depende de la temperatura, de la naturaleza química del sólido y de la concentración de la especie metálica. Los sistemas de adsorción biológica pueden ser naturales o artificiales. Los materiales como el quitosán, las macrófitas, las algas marinas y la biomasa bacteriana, han sido usados como medio de intercambio iónico. Esta biomasa puede reducir las concentraciones de iones de metales pesados hasta niveles muy bajos ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Perera y Baudot, 2001). Más adelante se detallarán las características de este tipo de biotecnología. Las aplicaciones de esta tecnología están limitadas a niveles de contaminante en un rango de concentración del orden de  $\text{mg L}^{-1}$  (Figura 2.1; Nemerow y Dasgupta, 1998).



**Figura 2.1** Tecnologías más utilizadas en la separación de metales pesados y otros contaminantes a partir de aguas contaminadas (Nemerow y Dasgupta, 1998).

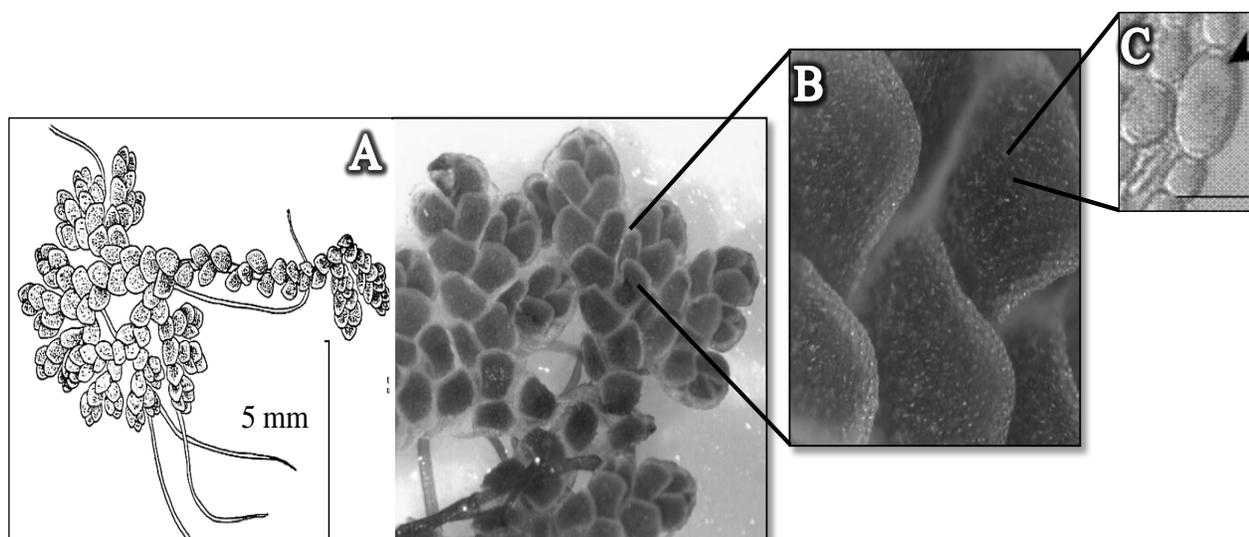
## 2.7 GENERALIDADES DEL SIMBIOSISTEMA *Azolla-Anabaena azollae*

El género *Azolla* pertenece a la familia Azollaceae, sobre la base de sus órganos reproductivos se divide en los subgéneros *Azolla* y *Rhizosperma* y seis especies (Mosquera y Calderón, 2002; Carrapico, 2005). Las especies que pertenecen a subgénero *Azolla* son *A. filiculoides*, *A. caroliniana*, *A. microphylla* y *A. mexicana*, mientras que las pertenecientes al subgénero *Rhizosperma* son *A. pinnata* y *A. nilotica* (Evrard y Van-Hove, 2004).

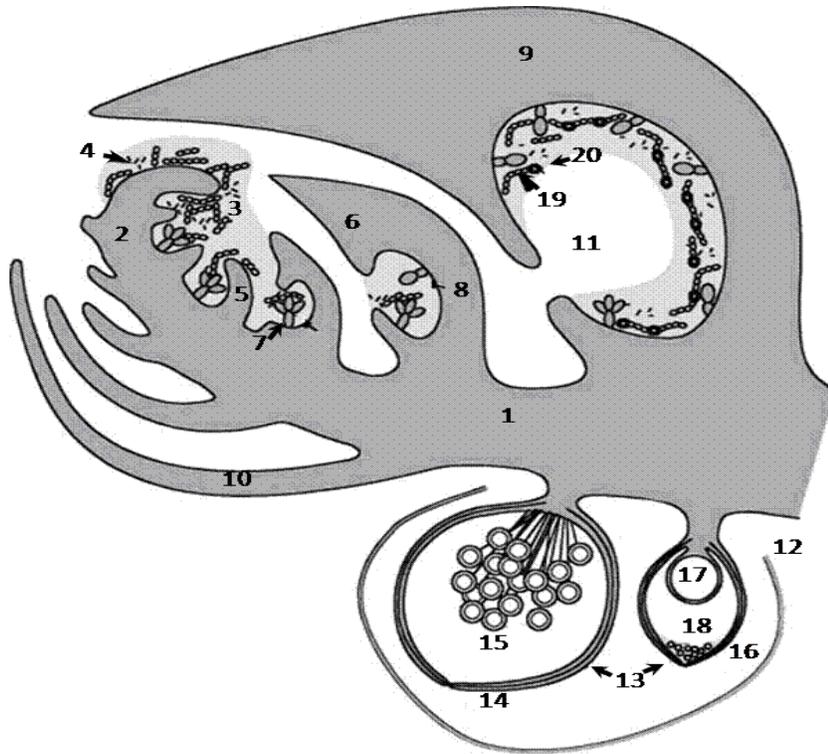
La *Azolla* es un helecho acuático flotante que vive en muchos cuerpos de agua dulce, y consiste en un esporofito corto y ramificado que posee raíces cortas y simples de 0.5 a 2.5 cm de largo que cuelgan hacia abajo en el agua (Figura 2.2A). La *Azolla* flota en la superficie del agua por sus numerosas frondas (hojas) pequeñas, alternas, bilobuladas y que se superponen

estrechamente unas a otras (Figura 2.2B). En cada fronda, el lóbulo superior contiene clorofila mientras que el lóbulo inferior es incoloro (Carrapico, 2001; 2006). Bajo ciertas condiciones también existe un pigmento de antocianina, que confiere al helecho un color entre rojizo y carmín, lo cual está asociado con la sobrefertilización del reservorio acuático, contaminación o también un exceso de luz solar (Pereira y Carrapico, 2009). En el lóbulo dorsal de la hoja de *Azolla*, habita y mantiene simbiosis con la cianobacteria *Anabaena azollae* (Figura 2.2C) y bacterias del género *Arthrobacter* y *Agrobacterium*. La cianobacteria *Anabaena* es un organismo fotosintético y se encuentra asociada con las plantas de *Azolla*, tanto en la fase sexual y asexual, como durante todo su ciclo de vida (Carrapico, 2001).

La reproducción de *Azolla* puede ser de dos tipos: una asexual o vegetativa y otra sexual. La vegetativa se da por la fragmentación de ramas laterales que se separan del tallo principal, por lo cual se formará una nueva planta (Espinoza y Gutiérrez, 2003). La reproducción sexual se da por dos tipos de espora (gametocitos macho y hembra) que se desarrollan dentro de un esporocarpo localizado en el envés de las hojas (Figura 2.3).



**Figura 2.2** *Azolla* sp (A), contiene en la cavidades de susfrondas (B) colonias de cianobacterias filamentosas de *Anabaena azollae* (C), con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. La fijación de nitrógeno se produce en los heterocistos (flecha, barra = 10 µm).



**Figura 2.3** Morfología de *Azolla* y esporocarpos (corte longitudinal). 1. Tallo; 2. Ápice del tallo; 3. Colonia apical de *Anabaena* sin heterocistos; 4. Otras bacterias; 5. Primordio foliar; 6. Hoja joven, 7. Filamento pluricelular ramificado; 8. Filamento simple bicelular; 9. Lóbulo hoja superior; 10. Lóbulo hoja inferior; 11. Cavidad de la hoja; 12. Megasporocarpo; 13. Indusia; 14. Esporocarpo; 15. Microsporangia; 16. Microesporocarpo; 17. Microesporangio; 18. Acinetes de *Anabaena*; 19. Células vegetativas de *Anabaena*; 20. Heterocisto (Modificado de Van-Hove, 1989).

Las esporas macho (microesporas) son verdosas o rojizas, tienen 2 mm de diámetro, y contienen numerosos esporangios macho con un solo anteridio que producirá ocho espermios nadantes. Las microesporas son extremadamente diminutas y tienden a formar pequeñas masas llamadas másulas. La microespora presenta un gloquidio que le permite adherirse y fertilizar a las megasporas femeninas (Carrapico y Pereira, 2005; Carrapico, 2006).

*Azolla* alberga a la cianobacteria *Anabaena azollae* como simbiote en el lóbulo de su hoja dorsal, cuyo beneficio se fundamenta en su capacidad para reducir el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a formas inorgánicas asimilables para la planta ( $NH_3$ ) (Quintero, 1995; Grilli

y Forni, 1999). En esta simbiosis se da un intercambio de metabolitos (compuestos nitrogenados) que produce la cianobacteria y fotosintatos de la *Azolla* (Carrapico, 2001; 2006). El proceso de fijación de N<sub>2</sub> se desarrolla en forma paralela al crecimiento de la planta. A medida que las hojas se desarrollan, la tasa de fijación aumenta. La capacidad de fijar nitrógeno atmosférico por parte del simbiosistema *Azolla-Anabaena*, es del orden de 3 kg ha<sup>-1</sup> de N por día, que varía con la especie, por ejemplo, su aplicación en terrenos cultivados con arroz se han encontrado tasas de fijación de nitrógeno entre 62-125 kg ha<sup>-1</sup> (Becking, 1986; Mayz-Figueroa, 2004).

El desarrollo del simbiosistema *Azolla-Anabaena* está dado por varios factores como la radiación (575 μm m<sup>-2</sup> seg<sup>-1</sup>), la temperatura (15° y 18° C), el pH (4.5 y 7.5), la conductividad eléctrica (>0.33 mmhos cm<sup>-1</sup>) y el contenido de nutrientes que condicionan la producción de biomasa, la tasa de crecimiento y la tasa de fijación biológica del nitrógeno. El principal elemento en la nutrición de *Azolla* es el fósforo (2 y 4 mg L<sup>-1</sup>) y sus requerimientos varían entre los ecotipos del helecho (Ferentinos *et al.*, 2002; Espinoza y Gutiérrez, 2004). La capacidad de *Azolla* para fijar N<sub>2</sub>, junto con su rápida propagación y su rápida tasa de duplicación de biomasa (3 a 6 d), su rápida descomposición en el suelo, así como el hecho de no transmitir enfermedades a los cultivos, la hacen útil como biofertilizante (Barrueco *et al.*, 1984; Quintero y Ferrera-Cerrato, 1992). El uso de *Azolla-Anabaena* en México se encuentra en fase de investigación, sin embargo, algunos trabajos (Quintero, 1995; Quintero y Ferrera-Cerrato, 2000) señalan que este simbiosistema representa una de las alternativas con gran potencial para disminuir la dependencia de los fertilizantes nitrogenados.

El simbiosistema *Azolla-Anabaena* puede ser cultivado en aguas residuales, y utilizado para la alimentación de animales, siempre y cuando las aguas no contengan sustancias tóxicas, y si este es el caso, la biomasa obtenida podría utilizarse para producir metano, por medio de

la digestión anaerobia (Ortega, 1980). La asociación *Azolla-Anabaena* alcanza niveles de proteína de hasta 38% de su biomasa, además de otros nutrientes (Cuadro 2.5). Este contenido proteínico, junto con su alta palatabilidad y su facilidad de suministro, la hace ideal para alimentación de cerdos, lechones, aves y ganado (Carrapico *et al.*, 2000).

**Cuadro 2.5** Composición química de *Azolla* en base a su peso seco (Carrapico *et al.*, 2000).

Contenido (%)		Contenido (%)	
Nitrógeno	5.0	Hierro	0.26
Fósforo	0.5	Grasas	3.0-3.3
Potasio	2.0-4.5	Azúcar	3.4-3.5
Calcio	0.1-1.0	Almidón	6.5
Magnesio	0.65	Clorofila	0.34-0.55
Manganeso	0.16	Cenizas	10.0

## 2.8 BIOTECNOLOGÍAS DIRIGIDAS A LA DESTOXIFICACIÓN DE AGUAS CONTAMINADAS

Las tecnologías biológicas para la destoxificación de aguas contaminadas con utilización de plantas acuáticas han sido desarrolladas como un tratamiento secundario o terciario alternativo, antes de devolver el agua a sus ciclos naturales (Celis *et al.*, 2005). Las plantas acuáticas actúan como filtros biológicos que estabilizan los contaminantes o bien degradan los componentes orgánicos. Además, se usan especialmente para cuerpos de agua contaminada con metales (Upadhyay *et al.*, 2007), plaguicidas (Miki *et al.*, 2006), hidrocarburos (Castro-Carrillo *et al.*, 2008) y lixiviados en vertederos (Cohen *et al.*, 2004).

Los desechos vegetales que se generan en los sistemas de destoxificación de aguas contaminadas con plantas acuáticas se pueden incorporar como fertilizante, composta, producción de combustible, producción de biogas, y como material absorbente de colorantes

(Celis *et al.*, 2005). Las plantas acuáticas usadas en la destoxificación de las aguas residuales deben tener: alta productividad (biomasa), alta eficiencia de remoción de nutrientes y contaminantes, alta predominancia en condiciones naturales adversas, y ser de fácil cosecha (Olguín *et al.*, 2007). El simbiosistema *Azolla-Anabaena* cumple con estas características, por lo que se propone su uso en la destoxificación de aguas contaminadas (Celis *et al.*, 2005; Olguín *et al.*, 2007).

## **2.9 EL SIMBIOSISTEMA *Azolla-Anabaena azollae* EN LA DESTOXIFICACIÓN DE AGUA CONTAMINADA CON METALES PESADOS O METALOIDES**

La contaminación con metales pesados o metaloides en los ecosistemas acuáticos se debe principalmente al vertido de aguas residuales de las industrias (Garbisu *et al.*, 2002). La interacción de los metales pesados o metaloides con el ecosistema depende de la forma y especie química en la que éstos se encuentren, además de otros factores como el pH, las condiciones de óxido-reducción del agua, y la presencia de sustancias orgánicas (Rahman *et al.*, 2007). El As, el Cd, el Cu, el Pb y el Hg son los elementos químicos considerados de interés prioritario en la destoxificación de ecosistemas acuáticos (Reeves, 2000). La acción de los metales pesados o metaloides se torna muy tóxica para el hombre como último consumidor de pescados y mariscos, que tienen la propiedad de acumularlos en sus tejidos (Volesky, 2001). A pesar de las evidencias del efecto en el deterioro de la salud por la exposición a los metales pesados o metaloides, son escasas las plantas acuáticas reportadas y utilizadas en la destoxificación de aguas residuales urbanas/industriales contaminadas con estos elementos.

El simbiosistema *Azolla-Anabaena* es eficiente en la destoxificación de aguas contaminadas al ser capaz de retener en sus tejidos diferentes metales pesados y/o metaloides (Cuadro 2.6). Algunas investigaciones (Kraus y Walter, 1987; Ortiz-Catón *et al.*, 1992;

Benaroya *et al.*, 2004) reportan el potencial del simbiosistema *Azolla-Anabaena* en la destoxificación de aguas contaminadas con Cd, Se, Cr, Cu, Ni y Pb. Los resultados demostraron que en condiciones experimentales de laboratorio, el simbiosistema *Azolla-Anabaena* resultó ser acumulador de Cd, Se y Cu, acumulador moderado de Cr, y exclusor de Ni y Pb. Las concentraciones más altas de cada elemento acumuladas fueron de 13.3 g Cd kg<sup>-1</sup>, 4.27 g Se kg<sup>-1</sup>, 3.36 g Cu kg<sup>-1</sup>, 2.87 g Cr kg<sup>-1</sup>, 1.79 g Ni kg<sup>-1</sup>, y 0.63 g Pb kg<sup>-1</sup>. Estos resultados demuestran el potencial del simbiosistema *Azolla-Anabaena* para la remoción de Cd, Se y Cu de aguas contaminadas con estos elementos. Por su parte, Morteza *et al.* (2005) reportan que *Azolla filiculoides* tiene capacidad de acumular y remover Pb (71%), Cd (64%), Ni (68%) y Zn (76%) de aguas residuales contaminadas.

Algunas investigaciones proponen mecanismos de cómo el simbiosistema *Azolla-Anabaena* tolera y acumula iones metálicos o metaloides, los cuales involucran la formación de complejos en la pared celular por la interacción entre el metal pesado con los polisacáridos constituyentes de dicha pared, como el ácido poligalacturónico. Otro mecanismo, que ocurre posterior a la absorción de los metales a través de las raíces, es la formación de complejos entre los grupos tiol presentes en las fitoquelatinas que transportan los metales pesados a la vacuola (Bennicelli *et al.*, 2004; Benaroya *et al.*, 2004).

Por su parte Rakhshae *et al.* (2006), reportan que los mecanismos de tolerancia y acumulación de Pb, Cd, Ni y Zn en *Azolla* se ven afectados por las formas de N. El uso de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> incrementa el crecimiento del helecho y la capacidad de acumulación de los metales pesados, mientras que el KNO<sub>3</sub> favorece el crecimiento de *Azolla*, pero disminuye su capacidad de acumulación de metales. Además de verse influidos estos mecanismos por factores como luz, pH, temperatura, además de la concentración del metal pesado.

**Cuadro 2.6.** Elementos metálicos removidos por *Azolla-Anabaena* partir de aguas contaminadas.

Especie de <i>Azolla</i>	Elemento Metálico	Concentración		ReferenciaBibliográfica
		Solución (mg L <sup>-1</sup> )	Tejido (mg kg <sup>-1</sup> )	
<i>A. filiculoides</i>	Ag	34	29	Kraus y Walter, 1987
<i>A. filiculoides</i>	U <sup>2+</sup>	20	3.05	Kraus y Walter, 1987
<i>A. filiculoides</i>	Cd	960	43	Benaroya <i>et al.</i> , 2004a
<i>A. filiculoides</i>	Cu	930	30	Sela <i>et al.</i> , 1989
<i>A. filiculoides</i>	Zn	1 065	56	Benaroya <i>et al.</i> , 2004
<i>A. filiculoides</i>	Ni	1 201	62	Krosravi <i>et al.</i> ,2005
<i>A. filiculoides</i>	Pb	20	0.30	Krosravi <i>et al.</i> ,2005
<i>A. caroliniana</i>	Hg	1.0	578	Bennicelli <i>et al.</i> ,2004
<i>A. caroliniana</i>	Cr <sup>6+</sup>	1.0	356	Bennicelli <i>et al.</i> ,2004
<i>A. caroliniana</i>	As	50	284	Zhang <i>et al.</i> , 2008
<i>A. microphylla</i>	Cr <sup>3+</sup>	10	500	Arora <i>et al.</i> ,2005

Las principales ventajas de utilizar el simbiosistema *Azolla-Anabaena* en la destoxificación de aguas, es la alta tasa de crecimiento, y su capacidad de acumular concentraciones altas de metales pesados y/o metaloides. Además de utilizar un recurso disponible hasta ahora no aprovechado en muchos lugares y que puede tener diversos usos. Por ejemplo, el simbiosistema *Azolla-Anabaena* ha sido empleado como biofiltro de aguas residuales, por su habilidad remover el P que causa eutroficación (Bennicelli *et al.*, 2004).

En conclusión, y con base a los antecedentes expuestos en el presente capítulo, se puede afirmar que el simbiosistema *Azolla-Anabaena* es una excelente alternativa biotecnológica en el tratamiento y la eliminación de metales pesados y metaloides del agua, presentando claras ventajas desde el punto de vista ambiental, económico y de aplicabilidad. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que ciertas especies de *Azolla* puedan coadyuvar a que la flora microbiana nativa acumule metales pesados o metaloides presentes en aguas contaminadas (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006; Olguin *et al.*, 2007).

## CAPÍTULO III

### CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DIEZ COLECTAS DEL GÉNERO *Azolla*

#### RESUMEN

Se identificaron a nivel de especie diez colectas de *Azolla* cultivadas en el *Azollatum* “Alfredo Echegaray Alemán”, Área de Microbiología del Suelo, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo (México) mediante técnicas moleculares. El análisis genético consistió en el aislamiento y la amplificación de regiones de ADN genómico. Después de la evaluación de los productos amplificados y polimorfismos generados por las combinaciones de los PCR en las diez cepas de *Azolla*, se seleccionaron las mejores combinaciones de oligonucleótidos. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de acrilamida y se visualizaron en tiempo real utilizando un secuenciador automático. Finalmente, las secuencias de ADN obtenidas se compararon con las bases de datos existentes en el Genebank. Las especies identificadas fueron: *Azolla filiculoides*, recolectada en Baja California (TEC y COY), Sinaloa (SIN), Distrito Federal (TLA), Morelos (JIU) y Tabasco (TAB); *Azolla rubra* recolectada en Veracruz (CEG); *Azolla mexicana* recolectada en Veracruz (XAL), y *Azolla microphylla* x *A. filiculoides* recolectada en Estado de México (TEX) y Baja California Sur (ENS). Estos resultados aportan información importante sobre algunas de las especies taxonómicas de *Azolla* de México con potencial biotecnológico para su evaluación en la destoxificación de sistemas acuáticos contaminados con metales pesados o metaloides.

**Palabras clave:** Análisis molecular, helechos acuáticos, PCR.

## CHAPTER III

### MOLECULAR CHARACTERIZATION OF TEN COLLECTS OF *Azolla*

#### ABSTRACT

Ten collects of *Azolla* from the *Azollatum* “Alfredo Echegaray Alemán” (Área de Microbiología del Suelo, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México) were molecularly identified at species level. The genetic analysis consisted on isolating and amplifying genomic DNA. After evaluating the amplified products and polymorphisms obtained by PCR from the ten collects of *Azolla*, the best combinations of oligonucleotides were selected. The amplified products were separated by acrylamide gels electrophoresis and visualized in real time via the utilization of automatic sequencer. Finally, the obtained DNA sequences were compared at the Genbank database. The identified species were: *Azolla filiculoides*, collected from Baja California (TEC and COY), Sinaloa (SIN), Distrito Federal (TLA), Morelos (JIU), and Tabasco (TAB); *Azolla rubra* collected from Veracruz (CEG); *Azolla mexicana* collected from Veracruz (XAL), and *Azolla microphylla* x *A. filiculoides* collected from Estado de México (TEX) and Baja California Sur (ENS). These results give relevant information about some *Azolla* taxa from Mexico with biotechnological potential for being evaluated in the detoxification of aquatic environments contaminated with heavy metals and/or metalloids.

**Key words:** *Aquatic fern, molecular analysis, PCR.*

### 3.1 INTRODUCCIÓN

*Azolla* es uno de los simbiosistemas más importantes en los ambientes acuáticos con funciones de importancia ecológica, económica y agronómica (COSEWIC, 2008). El género *Azolla* pertenece al orden Salvinales, de la familia Azollaceae. Con base en sus estructuras reproductivas este género está dividido en dos secciones (subgéneros), *Rhizosperma* y *Azolla*. La sección *Rhizosperma* considera dos especies, *Azolla nilotica* DeCaisne y *Azolla pinnata* Brown (Kannaiyan y Kumar, 2006). La sección *Azolla* ha sido tema de debate sin resultados satisfactorios, variando de dos a cinco especies: *A. caroliniana* Willdenow, *A. filiculoides* Lamarck, *A. mexicana* Presl, *A. microphylla* Kaulfuss, *A. rubra* Brown y *A. imbrica* Roxb. El debate en esta sección se centra en la identificación de las especies de *Azolla* “*mexicana*”, “*rubra*”, “*microphylla*” y “*caroliniana*” (Kannaiyan y Kumar, 2006, Metzgar *et al.*, 2007). Varios procedimientos para la identificación y la caracterización de los genotipos de *Azolla* se han desarrollado con base en caracteres morfológicos, bioquímicos o agronómicos. Los criterios para su clasificación son insuficientes para la identificación y caracterización de las especies de *Azolla*. Debido a esto, se han desarrollado técnicas genómicas, que permiten una identificación y caracterización más precisa (Reid *et al.*, 2006). El análisis de PCR, es una herramienta molecular que ha demostrado ser valiosa en el análisis genómico por presentar características más deseables de reproducibilidad y solidez (Sanderson, 2002). En virtud de la perspectiva que ofrece actualmente esta técnica, se propone analizar la diversidad genómica por PCR, de diferentes cepas de *Azolla* que fueron recolectadas en diferentes zonas geográficas en México (Zimmerman *et al.*, 1993), y contribuir en el conocimiento del genoma de este helecho en el país. Este conocimiento podrá facilitar la selección de especies de *Azolla* mantenidas *in-vivo* en el país con uso potencial como biotecnología de limpieza de cuerpos de agua contaminados con metaloides y metales pesados.

## 3.2 OBJETIVO

Caracterizar molecularmente a nivel de género y especie diez cepas de *Azolla* provenientes de diferentes zonas geográficas en México mediante la técnica de PCR.

## 3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.3.1 Condiciones de crecimiento de *Azolla*

El material genético utilizado fue aislado de diez cepas de *Azolla* provenientes de diferentes regiones geográficas de México (Cuadro 3.1), las cuales han sido mantenidas *in-vivo* como parte del *Azollatum* “Alfredo Echegaray Alemán” del Área de Microbiología del Suelo, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Las cepas de *Azolla* son continuamente mantenidas en condiciones de invernadero a  $25 \pm 5^\circ\text{C}$ , con fotoperiodos promedio de 12 h, utilizando la solución nutritiva de Yoshida ajustada a pH 5.5.

**Cuadro 3.1** Colectas de *Azolla* que integran el *Azollatum* “Alfredo Echegaray Alemán”, Área de Microbiología del Suelo, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Clave	Procedencia	Clasificación según Zimmerman <i>et al.</i> (1993)
CEG	Cerro Gordo, Veracruz	<i>Azolla caroliniana</i>
XAL	Xalapa, Veracruz	<i>Azolla filiculoides</i>
TEX	Texmelucan, Estado de México	<i>Azolla</i> sp.
TEC	Tecate, Baja California Sur	<i>Azolla</i> sp.
SIN	Guamuchil, Sinaloa	<i>Azolla mexicana</i>
TLA	Tlahuac, Distrito Federal	<i>Azolla filiculoides</i>
ENS	Ensenada, Baja California	<i>Azolla filiculoides</i>
JIU	Jiutepec, Morelos	<i>Azolla caroliniana</i>
TAB	Cárdenas, Tabasco	<i>Azolla caroliniana</i>
COY	Coyote, Baja California	<i>Azolla mexicana/caroliniana</i>

### **3.3.2 Amplificación, clonación y secuenciación del ADN de *Azolla***

La identificación taxonómica la realizó el M.C. Edgar Espinosa Hernández en el Laboratorio de Biología molecular en CINVESTAV, a partir del ADN genómico de diez colectas de *Azolla* usando el kit DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Santa Clarita, CA), siguiendo el protocolo descrito por el proveedor. La región intergénica de los rRNA fue amplificada utilizando los iniciadores ITS1 en una reacción con la enzima termoestable Takara ADN polymerase (Takara, Biosciences), de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Se obtuvo una banda de aproximadamente 800 pb, que se purificó y ligó al vector de clonación pDrive (Qiagen) a 16°C por 12 h. El ADN genómico se purificó usando el kit de “Miniprep plasmid ADN kit” (Qiagen), y fue digerido con la enzima EcoRI para verificar la presencia de insertos. Las secuencias de ADN obtenidas se compararon con las secuencias de referencia en las bases de datos existentes en el Genbank.

## **3.4 RESULTADOS**

### **3.4.1 Identificación taxonómica de colectas de *Azolla***

El alineamiento de las secuencias amplificadas (Anexo II) obtenidas con oligonucleótidos específicos para el espacio transcrito interno (ITS) a partir de ADN genómico, permitió la identificación taxonómica de las diez cepas de *Azolla* (Cuadro 3.2). La técnica de PCR utilizada corrobora la taxonomía de *Azolla filiculoides*, recolectada en Tlahuac, estado de México (TLA), y difiere en la identificación de las nueve colectas restantes de *Azolla* propuesta por Zimmerman *et al.* (1993), y da nombre a dos especies del helecho previamente no identificadas.

**Cuadro 3.2** Identificación taxonómica de colectas de *Azolla* que integran el *Azollatum* “Alfredo Echegaray Alemán”, Área de Microbiología del Suelo, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Clave	Origen geográfico	Clasificación según	Clasificación
		Zimmerman <i>et al.</i> (1993)	Xoconostle y Espinosa (2011)
CEG	Cerro Gordo, Veracruz	<i>Azolla caroliniana</i>	<i>Azolla rubra</i>
XAL	Xalapa, Veracruz	<i>Azolla filiculoides</i>	<i>Azolla mexicana</i>
TEX	Texmelucan, Estado de México	<i>Azolla</i> sp.	<i>Azolla microphylla</i> x <i>A. filiculoides</i>
TEC	Tecate, Baja California Sur	<i>Azolla</i> sp.	<i>Azolla filiculoides</i>
SIN	Guamuchil, Sinaloa	<i>Azolla mexicana</i>	<i>Azolla filiculoides</i>
TLA	Tlahuac, Distrito Federal	<i>Azolla filiculoides</i>	<i>Azolla filiculoides</i>
ENS	Ensenada, Baja California	<i>Azolla filiculoides</i>	<i>Azolla microphylla</i> x <i>A. filiculoides</i>
JIU	Jiutepec, Morelos	<i>Azolla caroliniana</i>	<i>Azolla filiculoides</i>
TAB	Cárdenas, Tabasco	<i>Azolla caroliniana</i>	<i>Azolla filiculoides</i>
COY	Coyote, Baja California	<i>Azolla mexicana/caroliniana</i>	<i>Azolla filiculoides</i>

La Figura 3.1, muestra la clasificación taxonómica de las colectas del helecho *Azolla* acorde a la homología con los vouchers de Reid & Peters del Genebank y la descripción filogenética que sugieren Smith *et al.* (2006) basados en datos morfológicos y moleculares.

Dominio: **Eukaryota**  
 Reino: **Plantae**  
 Subreino: **Viridiplantae**  
**Streptophyta**  
**Embryophyta**  
 Superdivisión: **Tracheophyta**  
 División: **Moniliformopses**  
 Clase: **Polypodiopsida**  
 Orden: **Salviniales**  
 Familia: **Azollaceae**  
 Género: ***Azolla***  
 Especies: ***rubra***  
                   ***mexicana***  
                   ***filiculoides***  
                   ***microphylla***

**Figura 3.1** Clasificación taxonómica de los diez helechos de *Azolla* que integran el *Azollatum* Alfredo Echegaray Alemán”, Área de Microbiología del Suelo, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo (Elaboración propia, 2011).

A continuación se describen las características de los helechos de *Azolla*, provenientes de diferentes áreas geográficas de México.

*Azolla rubra* (Clave CEG): (SITIO: EcoRI, GAATTC+AGAT, POSICIÓN: 1-6+7-10, SITIO FINAL: EcoRI, ATCAC+GAATTC, POSICIÓN: 939-943+944-949). La secuencia de ADN de la clona CEG mostró 96 % de homología con la referencia *Azolla rubra* DQ066492.1 y DQ066493.1 voucher Reid & Peters 90 y 89, respectivamente del espacio transcrito interno (ITS) 1 secuencia parcial y 2 secuencia completa; gen ribosomal RNA 5. Un segundo grupo de ITS fue identificado como homólogo (96%) a la referencia *Azolla filiculoides* DQ066494.1 voucher Reid & Peters 68 del espacio transcrito interno 2 secuencia parcial; gen ribosomal RNA 5.8S.

ACCESIÓN DQ066492

VERSIÓN DQ066492.1; DQ066493.1GI: 71068142

REFERENCIA 1 (1 a 858 bases). Reid, J.D., G.M. Plunkett, G.A. Peters, "Phylogenetic relationships in the heterosporous fern genus *Azolla* (Azollaceae) based on DNA sequence data from three non-coding regions", en *International Journal of Plant Science*, vol. 167, 529-538, 2006.

REFERENCIA 2 (1 a 858 bases). Reid, J.D., G.M. Plunkett, G.A. Peters, "Direct submission", en JOURNAL Submitted (17-MAY-2005) Dept. of Biology, Virginia Commonwealth University, PO Box 842012, Richmond, VA 23284, USA.

*Azolla mexicana* (Clave XAL): (SITIO: EcoRI, GAATTC+AGAT, POSICIÓN: 1-6+ 7-10, SITIO FINAL: EcoRI, ATCAC+GAATTC, POSICIÓN: 879-884). La secuencia de ADN de la clona XAL mostró 93% de homología con la referencia *Azolla mexicana* DQ066495.1 voucher Reid & Peters 74 del ITS1 secuencia completa; gen ribosomal RNA 5.8S, ITS2 secuencia parcial. Un segundo grupo de ITS fue identificado como homólogo (93%) a la referencia *Azolla microphylla* DQ066486.1 voucher Reid & Peters 79 del ITS1 y ITS2 secuencia parcial; gen ribosomal RNA 5.8S.

ACCESIÓN DQ066485

VERSIÓN DQ066485.1 GI: 71068135

REFERENCIA 1 (1 a 827 bases). Reid, J.D., G.M. Plunkett, G.A. Peters, “Phylogenetic relationships in the heterosporous fern genus *Azolla* (Azollaceae) based on ADN sequence data from three non-coding regions”, en *International Journal of Plant Science*, vol. 167, 529-538, 2006.

REFERENCIA 2 (1 a 827 bases). Reid, J.D., G.M., Plunkett, G.A. Peters, “Direct submission”, en JOURNAL Submitted (17-MAY-2005) Dept. of Biology, Virginia Commonwealth University, PO Box 842012, Richmond, VA 23284, USA.

*Azolla microphylla* x *Azolla filiculoides* (Clave TEX, ENS): (SITIO: EcoRI, GAATTC+AGAT, POSICIÓN: 1-6+7-10, SITIO FINAL: EcoRI, ATCAC+GAATTC, POSICIÓN: 913-918), y ENS (SITIO: EcoRI, GAATTC+GTGAT, POSICIÓN: 1-6+7-11). La secuencia de ADN de las clonas TEX y ENS mostró 99% de homología con la referencia *Azolla microphylla* x *Azolla filiculoides* AB560967.1 del ITS1 secuencia parcial y ITS2 secuencia completa; gen ribosomal RNA 5.8S. Un segundo grupo de ITS fue identificado como homólogo (96%) a la cepa de referencia *Azolla microphylla* DQ066487.1, DQ066486.1, DQ066482.1, DQ066481.1, DQ066472.1 y DQ066483.1 de Reid & Peters 70, 79, 80, 77, 81 y 75 respectivamente, del ITS1 secuencia parcial y ITS2 secuencia completa; gen ribosomal RNA 5.8S. Un tercer grupo de ITS fue identificado como homólogo (96%) a la referencia *Azolla mexicana*, DQ0664480.1, DQ0664781.1, DQ066477.1, DQ066485.1, DQ066479.1 y DQ066484.1 de los vauchers 76, 72, 73, 74, 64 y 71 respectivamente, del ITS1 secuencia completa y ITS2 secuencia parcial; gen ribosomal RNA 5.8S. Esta evidencia molecular sugiere la presencia de una mezcla de genes de *A. microphylla* con *A. filiculoides*.

ACCESIÓN AB560967

VERSIÓN AB560967.1 GI: 296277594

REFERENCE 1, Yokoyama, J., S., Nakai, T., Shimada, “Plants of genus *Azolla* (Azollaceae) newly recorded from Lake Izunuma”, en JOURNAL: Izunuma-Uchinuma Wetland Res. 4 (2010) *In press*.

REFERENCE 2 (bases 1 a 810), Yokoyama, J., S, Nakai, "Direct submission", en JOURNAL Submitted (14-MAY-2010) Contact: Jun Yokoyama Yamagata University, Department of Biology, Faculty of Science; Kojirakawa 1-4-12, Yamagata, Yamagata 990-8560, Japan

*Azolla filiculoides* (Clave TEC, SIN, TLA, JIU, TAB, COY): (SITIO: EcoRI, GAATTC+AGAT, POSICIÓN: 1-6+7-10, SITIO FINAL: EcoRI, ATCAC+GAATTC, POSICIÓN: 926-931); SIN (SITIO: EcoRI, GAATTC+AGAT, POSICIÓN: 1-6+7-10, SITIO FINAL: EcoRI, ATCAC+GAATTC, POSICION: 929-934); TLA (SITIO: EcoRI, GAATTC+AGAT, POSICIÓN: 1-6+7-10, SITIO FINAL: EcoRI, ATCAC+GAATTC, POSICIÓN: 929-934); JIU (SITIO FINAL: EcoRI, ATCAC+GAATTC, POSICIÓN: 928-933); TAB (SITIO: EcoRI, GAATTC+AGAT, POSICIÓN: 1-6+7-10 SITIO FINAL: EcoRI, ATCAC+GAATTC, POSICIÓN: 919-924); y COY (SITIO: EcoRI, GAATTC+AGAT, POSICIÓN: 1-6+7-10, SITIO FINAL: EcoRI, ATCAC+GAATTC, POSICIÓN: 928-933).

Las secuencias de ADN de las colectas TEC, SIN, TLA, JIU, TAB y COY mostraron 98% de homología con la referencia *Azolla filiculoides* DQ066494.1, Reid & Peters 68 del ITS1 secuencia parcial; gen ribosomal RNA 5.8S, ITS2 secuencia completa. Un segundo grupo de ITS fueron identificados como homólogos (97%) a *Azolla filiculoides* DQ066495.1 voucher Reid & Peters 92 del ITS2 secuencia parcial; gen ribosomal RNA 5.8S.

ACCESIÓN DQ066494

VERSIÓN DQ066494.1 GI: 71068144

REFERENCE 1(1 a 841 bases), Reid, J.D., G.M. Plunkett, G.A. Peters, "Phylogenetic relationships in the heterosporous fern genus *Azolla* (Azollaceae) based on DNA sequence data from three non-coding regions, en *International Journal of Plant Science*, vol. 167, 529-538, 2006

REFERENCE 2 (1 a 841 bases), Reid, J.D., G.M., Plunkett, G.A. Peters, "Direct submission", en JOURNAL Submitted (17-MAY-2005) Dept. of Biology, Virginia Commonwealth University, PO Box 842012, Richmond, VA 23284, USA.

### 3.5 DISCUSIÓN

La comparación de las secuencias obtenidas del Genbank y la secuenciación genética del ADN de las diez colectas de *Azolla* permitió ubicar la taxonomía de los helechos (Cuadro 3.2). Los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada helecho dentro de su propio grupo (Kannaiyan y Kumar, 2006). El análisis de los oligonucleótidos firma de RNAr de las distintas colectas de *Azolla* presentó máximos valores de similitud (93-99%) con respecto a las secuencias características y específicas que presentan los miembros del grupo filogenético de *Azolla*.

El análisis molecular del ADN comparado con las secuencias del Genbank mostró que las diez cepas del helecho *Azolla* (Figura 3.1) pertenecen al dominio Eukarya, que incluye los organismos multicelulares con núcleo verdadero, poseen orgánulos que realizan funciones especializadas, y están protegidos por una pared celular (Nickrent *et al.*, 2000). Reino Plantae que agrupa los organismos que convierten la energía de la luz del sol, CO<sub>2</sub> y agua en azúcares mediante el proceso de fotosíntesis, que utilizan como fuente de energía química para realizar sus actividades. Grupo monofilético Viridiplantae (algas verdes, chlorophyta y plantas terrestres), de la división Streptophyta que comprende a las embryophytas o “plantas terrestres” (hepáticas, antoceros, musgos, lycopodiófitos, helechos y plantas con semillas), y los descendientes de ciertas algas verdes no clorofitas. La característica de las Embryophytas es poseer un ciclo de vida haplo-diplonte la etapa de embrión por la que pasa el esporofito diploide, con gametofito (individuo de generación haploide) y el esporofito (individuo de la generación diploide) multicelulares (Nickrent *et al.*, 2000; Judd *et al.*, 2002).

*Azolla* pertenece a la división de las Tracheophyta también llamadas plantas vasculares, que poseen un ciclo de vida en el que se alternan las generaciones gametofítica y esporofítica, siendo esta última la fase dominante, fotosintética e independiente, y tiene tejidos y sistemas

de órganos (Bold *et al.*, 1989; Judd *et al.*, 2002). División Monilophyta que comprende a los helechos que se caracteriza por tener una inserción de nueve nucleótidos en el gen plastídico *rps4*. Los caracteres morfológicos son: a) lóbulos de protoxilema en forma de collar, pseudoesporas, tapete plasmodial, raíces adventicias originadas lateralmente en la endodermis y espermatozoides multiciliados (30-100 cilios o flagelos; Renzaglia *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2002). Los helechos de la clase Polypodiopsida se caracterizan por poseer megafilos (frondas) de prefoliación circinada (hojas jóvenes enrolladas en forma de báculo), y esporangio que se desarrolla a partir de una célula. El esporangio en estado maduro presenta una fila de células con paredes internas engrosadas y las internas adelgazadas (anillo). A este tipo de esporangio se le conoce como leptosporangiado (Smith *et al.*, 2006). La familia Salviniceae incluye plantas vasculares, con alternancia de generaciones, presenta heterosporia (posee dos morfos de esporas; las megasporas dan gametofitos femeninos y las microsporas dan gametofitos masculinos), hábito acuático, con esporas como unidad de dispersión y de resistencia. El gametofito es un talo (cuerpo sin organización), y el esporofito es un cormo (con raíz, vástago y sistema vascular). Poseen esporofitos con megafilos o frondas, con raíces presentes (*Azolla*) o ausentes (*Salvinia*). La *Azolla* es un género de siete especies de helechos acuáticos flotantes, de frondas pequeñas y raíces cortas (Schneider *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2006).

El número de especies de *Azolla* varió poco y algunas especies fueron comunes para algunos sitios; sin embargo, los resultados del presente estudio son un registro de las especies de *Azolla* nativas de México. De acuerdo con el análisis molecular de las colectas de *Azolla* mantenidas *in-vivo* en el *Azollatum* “Alfredo Echegaray Alemán”, la especie con mayor presencia en diferentes áreas geográficas de México fue *Azolla filiculoides* (Cuadro 2.1). Esta especie se localizó en seis de los diez sitios de recolecta: Tecate, Baja California (TEC);

Guamuchil, Sinaloa (SIN); Tlahuac, D.F. (TLA); Jiutepec, Morelos (JIU); Cárdenas, Tabasco (TAB) y Coyote, Baja California (COY). Lo anterior, sugiere que *A. filiculoides* presenta mayor adaptación ecológica a la diversidad de condiciones ambientales del país. De acuerdo con algunos autores (Khosravi *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008) *A. filiculoides* ha mostrado capacidad de absorber  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{4+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{As}^{3+}$  de ambientes acuáticos, y que esta especie presenta cierta capacidad de adaptación la cual lleva implícita un mecanismo de tolerancia y que esto influye en su mayor efectividad para absorber metales pesados y metaloides de ambientes acuáticos (Antunes *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2008).

*Azolla rubra* se encontró en uno de los diez sitios de recolecta Cerro Gordo, Veracruz (CEG). Anteriormente, esta colecta fue clasificada como *A. caroliniana* utilizando marcadores moleculares (Zimmerman *et al.*, 1993). Shinyet *al.* (2004) evaluaron la capacidad de remoción de  $\text{Cr}^{3+}$  en *Azolla rubra*, encontrando que el helecho tiene la capacidad de remover de 40 a 99% del cromo en solución, después de siete días de exposición. En contraste, *A. caroliniana* se ha localizado creciendo en aguas contaminadas con  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{4+}$ ,  $\text{As}^{5+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  (Bennicelli *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008). Castro-Carrillo *et al.* (2008) sugieren que *A. caroliniana* tolera concentraciones de 40 mg de fenantreno en solución, y al crecer en consorcio con *Bacillus stearothermophilus* y *Oscillatoria* sp incrementa su capacidad de remover este hidrocarburo.

*Azolla mexicana* se recolectó en Xalapa, Veracruz (XAL) de los diez sitios de recolecta, y *A. microphylla* se encontró solo en dos (Texmelucan TEX y Ensenada, ENS) de los 12 sitios de recolecta. Las colectas TEX y ENS presentaron homología con *A. microphylla* x *A. filiculoides*. Shiomi y Kitoh (1996) evaluaron la capacidad de remoción de amonio por diferentes especies de *Azolla* y las compararon entre ellas, reportaron que *A. mexicana* y *A. microphylla* son especies que inhiben su crecimiento ante  $20 \text{ mM L}^{-1}$  de amonio, tienen bajos

índices de tolerancia (0.48 y 0.51, respectivamente), además de baja capacidad de remoción del contaminante. Sin embargo, no se encontró literatura que evalúe la capacidad de ambas especies de *Azolla* ante metales pesados o metaloides.

La importancia de la identificación taxonómica de las cepas de *Azolla* mantenidas *in-vivo* en el *Azollatum* radica en el hecho de que algunas características particulares de cada especie influyen en distinto grado en el crecimiento, tolerancia y capacidad de sobrevivir en ambientes contaminados, aspecto que resulta interesante de investigar en profundidad. Uno de los problemas ambientales que ha suscitado mayor interés mundial en la última década es la pérdida de la diversidad de especies vegetales como consecuencia de la contaminación ambiental. Sin embargo, la información disponible es escasa sobre las especies de *Azolla* ampliamente distribuidas en el territorio mexicano; más aún sobre las especies de este helecho tolerantes a metaloides y metales pesados como alternativa de destoxificación de aguas contaminadas. Además, su aplicación biotecnológica como elemento purificador de agua requiere de la selección de especies tolerantes a metaloides y metales pesados, que permita un mayor entendimiento de sus mecanismos que inducen su crecimiento en estos ambientes.

El número de especies de *Azolla* varió poco y algunas fueron comunes para algunos sitios; sin embargo, las especies de *Azolla filiculoides*, *A. rubra*, *A. caroliniana* y *A. mexicana* ya han sido reportadas en otros países con capacidad de tolerar y acumular concentraciones altas de metales pesados (Pb, Cd, Ni, Zn, Cr, Hg), en los que se ha indicado que los incrementos en las concentraciones de estos elementos causan disminución de biomasa viva (Bennicelli *et al.*, 2004; Khosravi *et al.*, 2005).

### 3.6 CONCLUSIONES

La técnica de PCR permitió identificar taxonómicamente con certeza mayor al 90% a nivel de género y especie, diez colectas de *Azolla* provenientes de diferentes áreas geográficas de México.

La colecta *Azolla filiculoides* nativa de seis áreas geográficas de México fue seleccionada para evaluar los mecanismos de tolerancia y acumulación ante arsénico y cobre, junto con *A. caroliniana* (*Azolla rubra*), debido a su amplia distribución en el país. Además, estas especies han sido reportadas en la literatura de otros países como hiperacumuladoras de metales pesados y metaloides.

## CAPÍTULO IV

### EFFECTO TÓXICO DEL ARSENATO EN EL CONTENIDO DE CLOROFILA, CAROTENOIDES Y COMPUESTOS FENÓLICOS DE *Azolla filiculoides*\*

#### RESUMEN

Este estudio evaluó la toxicidad de dosis concentraciones crecientes de arsénico y la acumulación de este metaloide en las frondas de *Azolla filiculoides*. El helecho se propagó y expuso a solución Yoshida contaminada con seis concentraciones de arseniato de sodio (0, 5, 10, 20 y 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), bajo condiciones controladas de cámara de crecimiento durante 96 h. *Azolla filiculoides* toleró concentraciones inferiores a 60  $\mu\text{g As mL}^{-1}$ . El nivel máximo de acumulación (28  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) se observó al exponer al helecho ante 60  $\mu\text{g As mL}^{-1}$ , pero observándose efectos tóxicos. La exposición de *Azolla* a concentraciones mayores a 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  disminuyó significativamente el contenido de clorofila, la actividad antioxidante total, los compuestos fenólicos totales, aunque aumentó significativamente el contenido de los carotenoides totales + xantofilas.

**Palabras clave:** *Actividad antioxidante, contaminación, clorofila, fenólicos, helecho, metaloide.*

\*Este capítulo resultó en la publicación del artículo científico en la revista Water, Air, & Soil Pollution, factor de impacto 1.765 (Anexo III).

## CHAPTER IV

### TOXIC EFFECTS OF ARSENATE ON THE CHLOROPHYLL CONTENT, CAROTENOIDS AND PHENOLIC COMPOUNDS OF *Azolla filiculoides*

#### ABSTRACT

This study evaluated the toxicity of increased doses of arsenic and the accumulation of this metalloid in the fronds of *Azolla filiculoides*. The fern was propagated and exposed to Yoshida's nutrient solution contaminated with six concentrations of sodium arsenate (0, 5, 10, 20 and 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) under plant growth chamber conditions for 96 h. *Azolla filiculoides* tolerate As concentrations lower than 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The maximum level of As accumulation (28  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) was observed when the fern was exposed to 60  $\mu\text{g As mL}^{-1}$ , but exerting toxic effects. The exposure of *Azolla* to As concentrations greater than 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  significantly diminished the chlorophyll content, the total antioxidant activity, and the total phenolic compounds, although it significantly increased the total content of carotenoids + xanthophylls.

**Keys words:** *Antioxidant activity, chlorophyll, contamination, fern, metalloid, phenolic.*

#### 4.1 INTRODUCCIÓN

El Arsénico (As) es un contaminante inorgánico ampliamente distribuido en la naturaleza, cuyas formas químicas principales son sulfuro de arsénico ( $\text{As}_2\text{S}_2$ ) y arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ) (Matschullat, 2000), y es considerado uno de los contaminantes más tóxicos para los organismos vivos (Rudra, 2006). Las concentraciones naturales de As en los depósitos de aguas superficiales y subterráneas, pueden ser consecuencia de procesos geológicos tales como erosión de las rocas, la erosión y la lixiviación (Lepp, 1981). Sin embargo, las actividades industriales y mineras también representan una de las principales fuentes de contaminación de los cuerpos de agua, en donde este metaloide es uno de los problemas ambientales más críticos, debido a su alta toxicidad, persistencia y capacidad para acumularse en organismos vivos (Bruce *et al.*, 2003).

La forma principal de arsénico en el agua es como compuestos insolubles, como el  $\text{As}^{5+}$  o  $\text{As}^{3+}$  (Lesikar *et al.*, 2006). En el agua superficial, el As puede ser tóxico para las plantas acuáticas en concentraciones inferiores a  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ , mientras que las concentraciones cerca de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  pueden ser tóxicas para los peces, lo que tiende a ser un riesgo ambiental y para la salud humana (Rahman, 2007; Miller *et al.*, 2007). Se han propuesto varias tecnologías para disminuir la contaminación, como la fitorremediación, que consiste en la utilización de algunas plantas con capacidad de acumular, eliminar o neutralizar los contaminantes orgánicos, así como metales pesados o metaloides, para la limpieza de ambientes contaminados (Salt *et al.*, 1998; Gravisu *et al.*, 2002; Pilon-Smits, 2005).

Los procesos de fitorremediación incluyen la fitoextracción en la que las plantas no sólo acumulan sino que también eliminan los contaminantes del suelo, agua o atmósfera (Pilon-Smits, 2005). Entre las plantas utilizadas para fitorremediar ambientes acuáticos contaminados con metales pesados o metaloides, están algunas especies de helechos que poseen la capacidad

de acumular los metales y metaloides, en concentraciones que para la mayoría de las plantas pueden ser tóxicas (Ma *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2004). Por ejemplo, las frondas de *Pteris vittata* acumulan concentraciones de arsénico superiores a 22000 mg kg<sup>-1</sup> (Ma *et al.*, 2001). Algunas otras especies de helechos hiperacumuladores de As incluyen *Ptyrogramma calomel* cuya acumulación se detectó en frondas (88 mg kg<sup>-1</sup>) y rizomas (310 mg kg<sup>-1</sup>; Francesconi *et al.*, 2002). Más recientemente, Chao-Yang y Tong-Bin (2006) reportaron acumulaciones de As entre 3 y 704 mg kg<sup>-1</sup> para *Pteris cretica*. *Azolla* es un helecho acuático, que es importante en los sistemas de producción sostenible de arroz (Hove y Lejeune, 2002). Asimismo, el helecho *Azolla* se ha reportado como un componente biológico importante para la limpieza de las aguas superficiales contaminadas con compuestos inorgánicos u orgánicos (Ortiz-Catón *et al.*, 1992, Castro-Carrillo *et al.*, 2008). Algunas investigaciones reportan la tolerancia y el potencial de acumulación de contaminantes en algunas especies de *Azolla* expuestas a metales pesados como Cd, Pb, Cr, Cu, Ni, y Zn (Krosravi *et al.*, 2005; Stepniewska *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008). Sin embargo, la información sobre la respuesta fisiológica de las especies de *Azolla* en cuerpos de agua contaminada con arsénico es aún incipiente, así como las posibles alteraciones que produce el metaloide en el contenido de pigmentos fotosintéticos.

## 4.2 OBJETIVO

Evaluar la capacidad de acumulación de arsénico en *Azolla filiculoides* y el efecto tóxico del metaloide sobre el crecimiento, los pigmentos fotosintéticos y la fisiología del helecho.

## 4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.3.1 Material biológico y establecimiento del experimento

El helecho *Azolla filiculoides* (*Azollatum* del Colegio de Postgraduados; Zimmerman *et al.*, 1993) se utilizó como organismo de prueba, ya que ha sido previamente reportado como un helecho acuático capaz de hiperacumular arsénico (Zhang *et al.*, 2008). Las frondas de *Azolla* (1 g de peso fresco) fueron colocadas en recipientes de plástico (80 mL de capacidad), con 50 mL de solución nutritiva de Yoshida (pH 5,5; Anexo I, Yoshida *et al.*, 1971; Castro-Carrillo *et al.*, 2008). A la solución nutritiva se adicionó una serie de concentraciones (5 a 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de arsenato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Sigma-Aldrich®), y como testigo se utilizó la solución nutritiva sin contaminante. El experimento se mantuvo en condiciones de cámara de crecimiento (26°C, 12 h fotoperíodo, luz 280  $\mu\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ , y 80% HR; Lab-Line Biotronette), durante 96 h. El nivel de la solución nutritiva de cada recipiente fue abastecido diario con la solución nutritiva de Yoshida.

### 4.3.2 Crecimiento, y pigmentos fotosintéticos

Después de 96 h, la biomasa del helecho se cosechó y se secó a peso constante a 70 °C durante 72 h y luego se pesó para calcular la biomasa seca total. El porcentaje de inhibición o estimulación de crecimiento por la contaminación se obtuvo de la relación del peso seco de la biomasa en cada concentración evaluada y el total de la biomasa seca del testigo (sin contaminación) considerada como el 100%. El contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofilaa, b, total, y carotenoides + xantofilas totales) se estimó mediante la extracción de los pigmentos de los tejido del helecho (~ 30 mg de peso fresco) con acetona 100%, con un espectrofotómetro (BioTekSinergy2) tomando lecturas de absorbancia a 470, 645, y 662 nm, y la concentración se calculó con las ecuaciones propuestas por Lichtenthaler (1987).

### **4.3.3 Actividad antioxidante total y compuestos fenólicos totales**

Para la determinación de la actividad antioxidante total (AOX), y los compuestos fenólicos totales se maceraron las frondas de *Azolla* con metanol al 80%. La actividad antioxidante total fue determinada mediante el ensayo de decoloración del radical 1,1-difenil-2-picrildrazil (DPPH) empleando Trolox como compuesto antioxidante (Matthäus, 2002). Se tomaron alícuotas de 75 µL de los extractos de tejido y se colocaron en microplacas de 96 pozos, a las que se adicionó 250 µL de DPPH. Las lecturas de absorbancia inicial se midieron a 515 nm, se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos, y se tomaron lecturas de absorbancia final. Los compuestos fenólicos totales fueron determinados mediante el ensayo con el reactivo Folin-Ciocalteu, utilizando ácido clorogénico como estándar (Singleton y Rossi, 1965; Soong y Barlow, 2004). La mezcla de reacción consistió en 30 µL del extracto de tejido, con 90 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 150 µL de reactivo Folin-Ciocalteu en microplacas de 96 pozos. Después de 30 minutos, se midió la absorbancia a 725 nm. Ambas determinaciones fisiológicas se realizaron con un espectrofotómetro (Bio-Tek Sinergy 2, Instruments, Inc. Winooski, VT, EE.UU.).

### **4.3.4 Acumulación de arsénico en frondas de *Azolla***

La acumulación de arsénico en el tejido *Azolla* se determinó mediante espectrometría de plasma acoplado por inducción de masas, al final del experimento, por triplicado (EPA, 1994, Método de 200,8). Las frondas secas (0.2 g) fueron maceradas, pesadas e inmediatamente predigeridas con 4 mL de la mezcla de ácido sulfúrico y perclórico (4:1 v/v) durante 12 h, y luego digeridas a 150 °C. La solución final se filtró y se ajustó el volumen final a 10 mL. El contenido de arsénico en las frondas se analizó en un espectrómetro de plasma acoplado por inducción de masas (ICP-AES Liberty Series II, EL97053010).

### **4.3.5 Análisis estadístico**

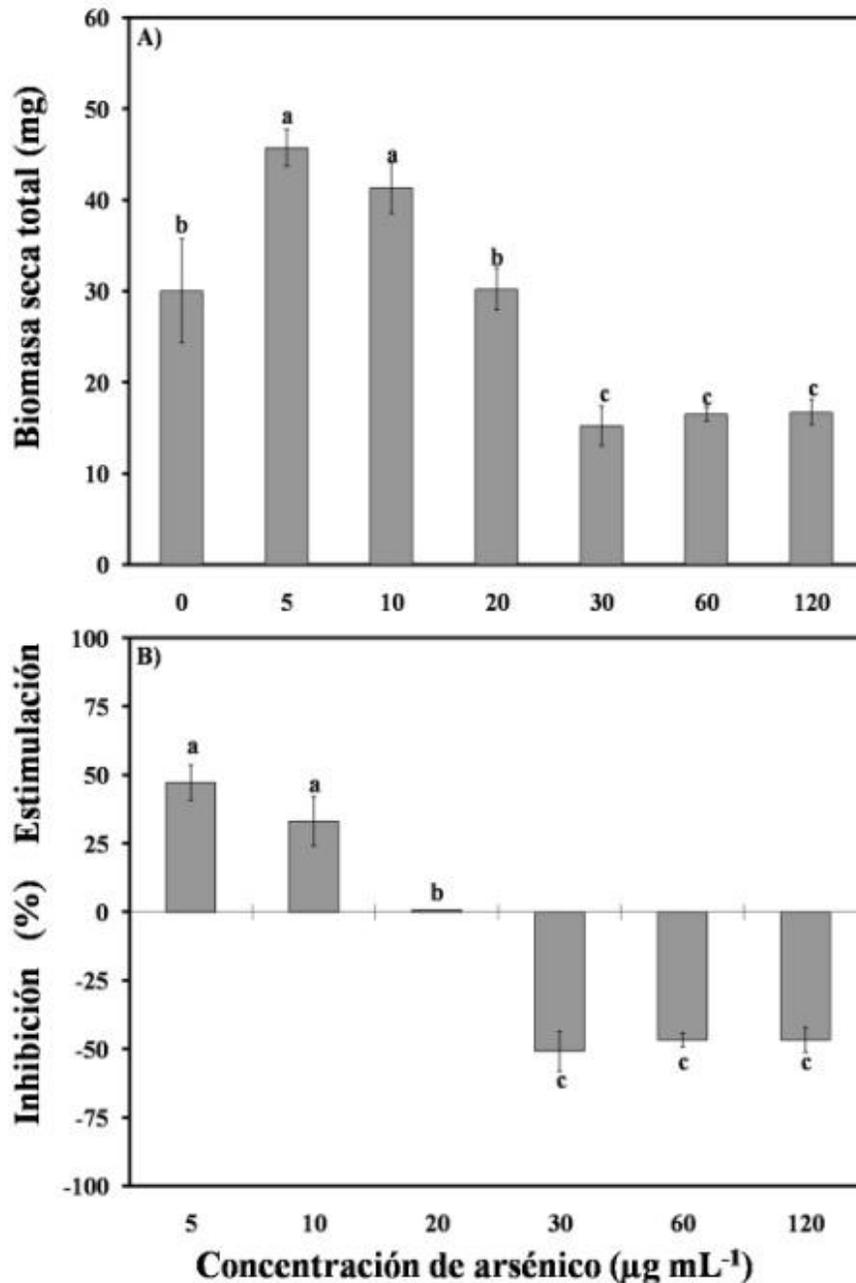
Se utilizó un diseño completamente al azar, con siete tratamientos con cuatro repeticiones cada uno. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ; SAS Institute Inc., 2002). El número de repeticiones fueron los siguientes: las respuestas de crecimiento de *Azolla*,  $n=3$ ; clorofila (total, *a*, *b*) y carotenoides totales + xantofilas,  $n=6$ ; la actividad antioxidante y compuestos fenólicos,  $n=6$ ; la acumulación de arsénico en el tejido del helecho,  $n=3$ .

## **4.4 RESULTADOS**

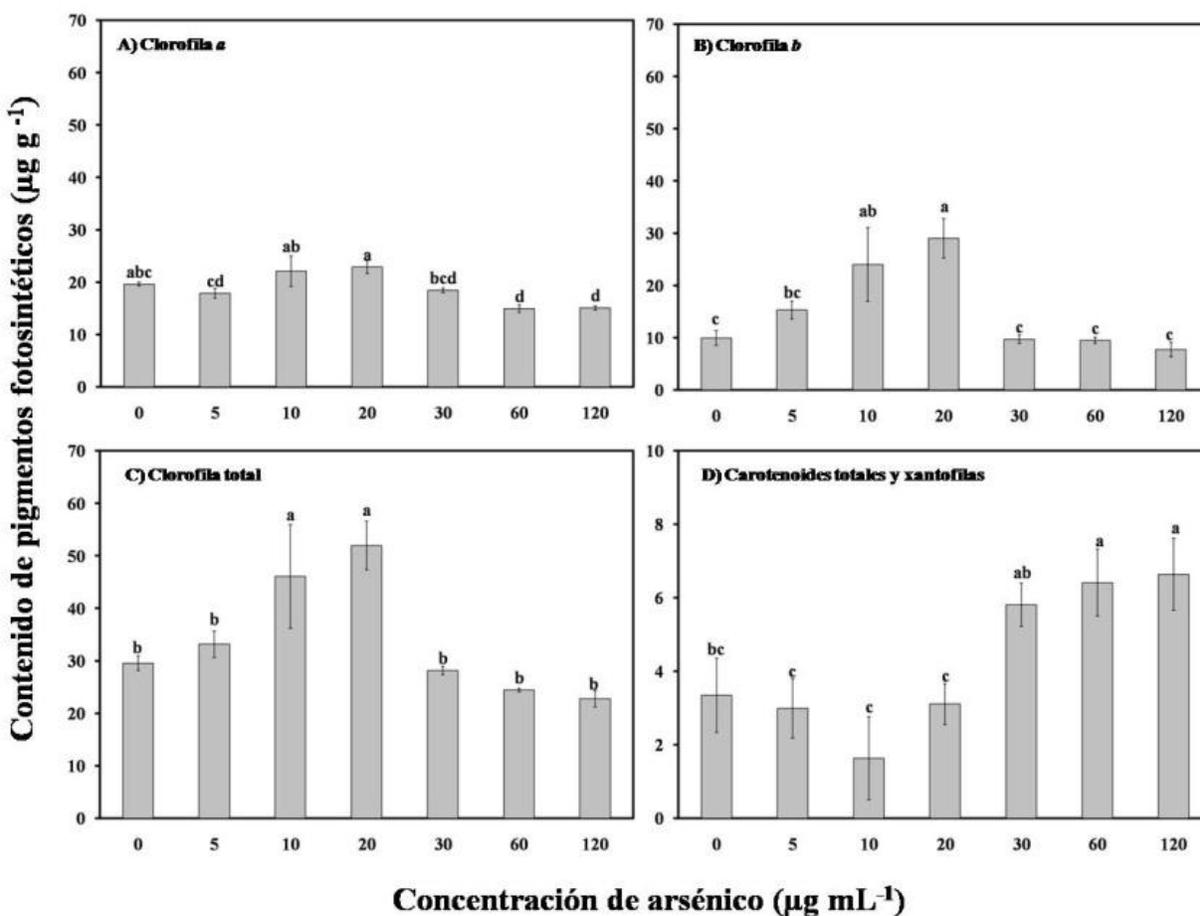
### **4.4.1 Afectación del crecimiento y pigmentos fotosintéticos de *Azolla* por exposición a arsénico**

El crecimiento de *Azolla* se vio afectado significativamente ( $p \leq 0.001$ ) conforme se incrementó la concentración de As en la solución nutritiva, expresado en la producción de biomasa seca. Las concentraciones mayores a  $20 \mu\text{g As mL}^{-1}$  redujeron significativamente el peso seco total (Figura 4.1A). Las concentraciones de As de 5 ó  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  estimularon la producción de materia seca total en 47.2% y 33.2%, respectivamente, en comparación con el testigo (Figura 4.1B). En contraste, a concentraciones de 30, 60 y  $120 \mu\text{g As mL}^{-1}$  se observó la inhibición del crecimiento entre 50% y 46% (Figura 4.1B). El contenido de pigmentos fotosintéticos se afectó significativamente ( $p \leq 0.001$ ) conforme se incrementó la concentración de As. Los contenidos de clorofila *a* y *b* se redujeron significativamente en los tratamientos con 60 ó  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 4.2). El contenido de clorofila total fue significativamente mayor en las concentraciones de 10 ó  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , en comparación con el testigo (Figura 4.2); sin embargo, el contenido de clorofila total a 60 y  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$  disminuyó significativamente (Figura 4.2). Por otra parte, la adición de As a la solución nutritiva afectó significativamente

( $p \leq 0.001$ ) el contenido en carotenoides totales + xantofilas. El contenido de carotenoides + xantofilas fue significativamente más bajo en las concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  As, que en las concentraciones superiores a 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 4.1).



**Figura 4.1** A) Biomasa seca total, y B) estimulación/inhibición en crecimiento de *Azolla filiculoides* después de 96 h de exposición a diferentes concentraciones de arsenato de sodio en la solución nutritiva. Media  $\pm$  error estándar.  $n=3$ . Letras diferentes sobre las barras, indican diferencias significativas entre tratamientos según Tukey  $\alpha=0.05$ .

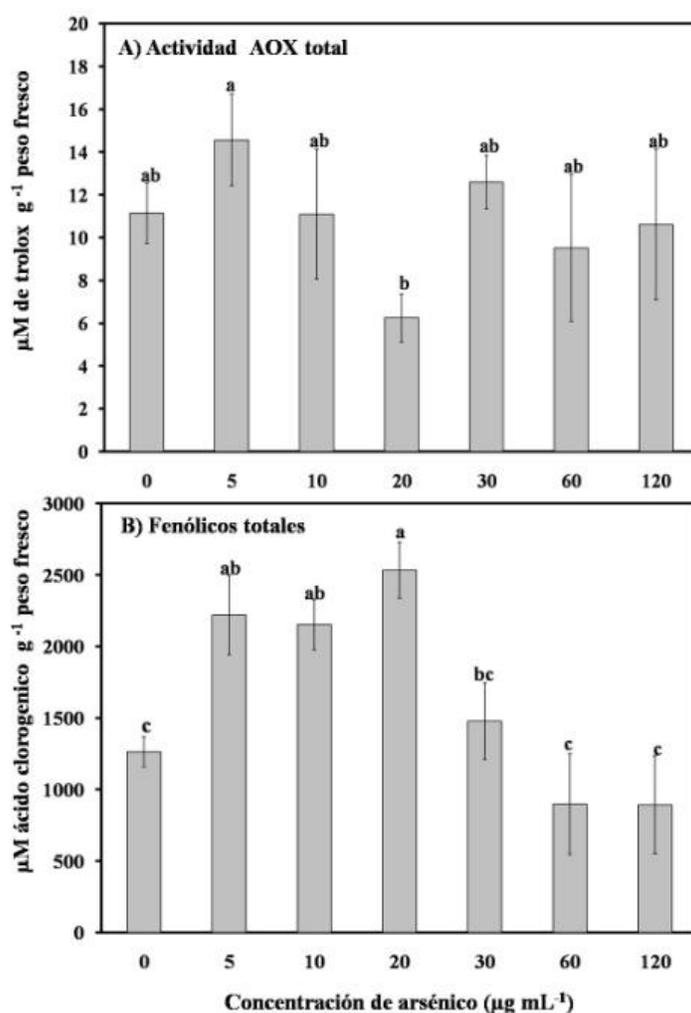


**Figura 4.2** Contenido de pigmentos fotosintéticos de *Azolla filiculoides*, después de 96 h de exposición antearsénico. Medias  $\pm$  error estándar.  $n=6$ . Letras diferentes sobre las barras, indican diferencias significativas entre tratamientos según Tukey  $\alpha=0.05$ .

#### 4.4.2 Respuesta de *Azolla* en la actividad antioxidante total y compuestos fenólicos totales por exposición a arsénico

Las respuestas fisiológicas del helecho *Azolla* expuesto a concentraciones crecientes de As fueron evaluadas a través de la determinación de la actividad antioxidante total (AOX) y el contenido de compuestos fenólicos totales. Para la AOX, no hubo diferencias significativas entre tratamientos. La mayor actividad AOX se observó ante  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  en comparación con el testigo, mientras que la menor AOX de *Azolla* fue a  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 4.3A). Los

tratamientos expuestos a 20 y 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  mostraron 34% menor actividad antioxidante (en promedio 7.8 mM  $\text{g}^{-1}$ ), en comparación con la actividad promedio para el resto de los tratamientos (11.9 mM  $\text{g}^{-1}$ ). Para el contenido total de compuestos fenólicos, el As indujo efectos significativos ( $p \leq 0.001$ ). El mayor contenido de compuestos fenólicos totales se observó en la concentración de 5, 10 y 20  $\mu\text{g As mL}^{-1}$ . En contraste, los valores más bajos de compuestos fenólicos se obtuvieron para los tratamientos expuestos a 60 ó 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en comparación con el testigo (Figura 4.3B).



**Figura 4.3** Actividad antioxidante total (A), y contenido de fenólicos totales (B) de *Azolla filiculoides* expuesto a diferentes concentraciones de arsenato de sodio en la solución nutritiva, después de 96 h. Medias  $\pm$  error estándar, n=6. Letras diferentes sobre las barras, indican diferencias significativas entre tratamientos según Tukey  $\alpha=0.05$ .

#### 4.4.3 Acumulación de arsénico en frondas de *Azolla*

El tejido de *Azolla* acumuló arsénico significativamente ( $p \leq 0.001$ ), lo que disminuyó la concentración de As en la solución nutritiva (Figura 4.4). La mayor acumulación de As ( $28 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) se observó al exponer al helecho ante  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A concentraciones bajas ( $5$  a  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), la acumulación de este metaloide en el tejido del helecho fue en promedio de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 4.4). Aun cuando la mayor acumulación de As ocurrió ante  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ , se observaron síntomas de toxicidad lo que se manifestó en la inhibición del crecimiento de este helecho en las dos concentraciones del metaloide (Figura 4.4).

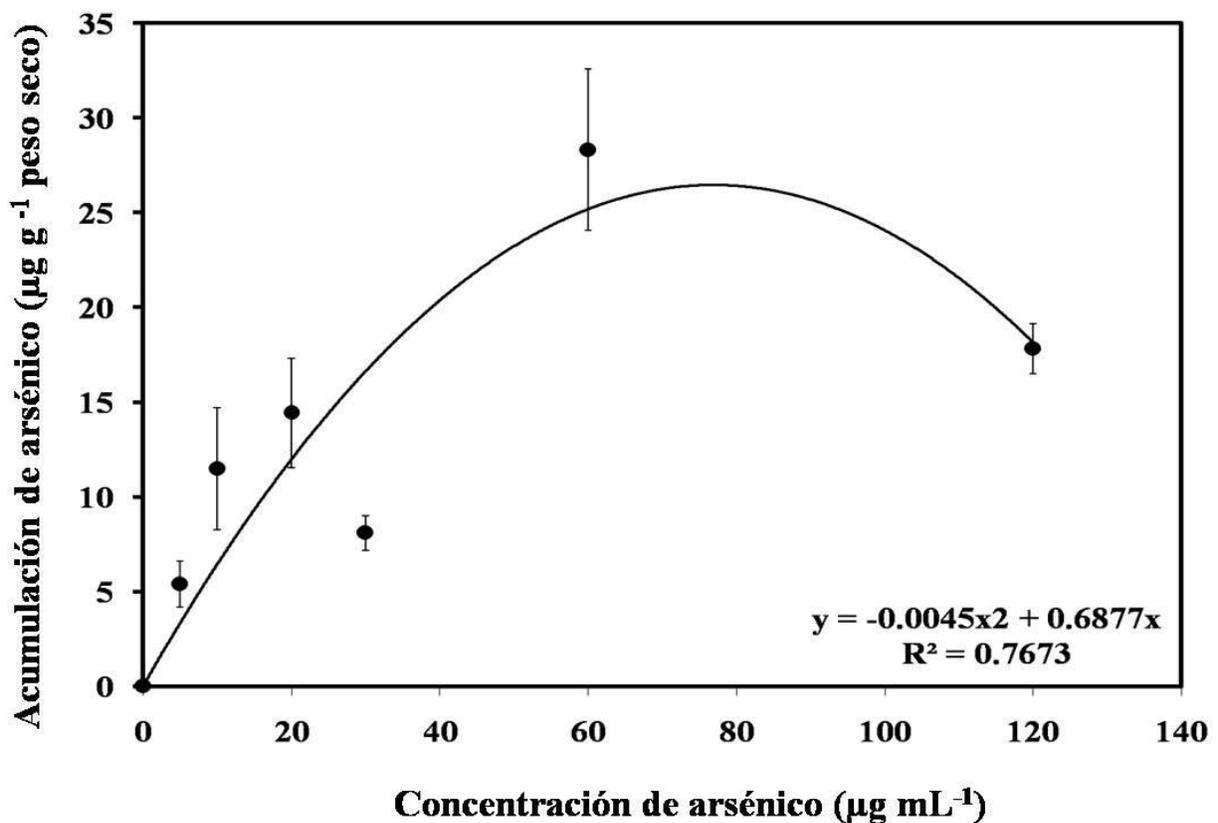


Figura 4.4 Acumulación de arsénico en frondas de *Azolla filiculoides* después de 96 h de exposición a concentraciones crecientes de arsénico en la solución nutritiva. Medias  $\pm$  error estándar,  $n=3$ .

## 4.5 DISCUSIÓN

Los compuestos contaminantes del agua (orgánicos e inorgánicos) afectan la adaptación y el crecimiento de helechos como *Azolla* (Zhao *et al.*, 2002a; Castro-Carrillo *et al.*, 2008). En este estudio se observó que a concentraciones bajas de As ( $5$  y  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) hubo un efecto estimulante en el crecimiento del helecho acuático en comparación con el testigo (Figura 4.1). Sin embargo, el incremento en la concentración de este metaloide dio como resultado la inhibición significativa en el crecimiento de *Azolla*. Este efecto inhibitorio se observó a partir de la concentración de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , en la que *Azolla* produjo materia seca total equivalente al testigo (Figura 4.1B). La inhibición del crecimiento de *Azolla* fue el resultado de la exposición a altas concentraciones de As, y como consecuencia de la acumulación alta del arsenato en el tejido del helecho (Figura 4.2). Se sabe que el arsénico interfiere en la absorción de fósforo por la célula debido a su afinidad por los transportadores de fosfato, estableciendo una competencia con ambos aniones (Meharg, 2002; Meharg y Hartley-Whitaker, 2002). Sin embargo, el contenido de P en el tejido *Azolla* no se determinó en esta fase del estudio. Meharg (1994) mencionó que la competencia entre As y P da como resultado el bloqueo de la cadena de transporte de electrones en las membranas de la célula por la que la síntesis de ATP se inhibe significativamente. Esto puede explicar en parte por qué el helecho *Azolla* mostró inhibición de crecimiento cuando se expuso a concentraciones superiores a  $30 \mu\text{g As mL}^{-1}$ .

Poco se sabe acerca de las respuestas fisiológicas del helecho *Azolla* cuando se expone a altas concentraciones de contaminantes orgánicos en el agua (Castro-Carrillo *et al.*, 2008). El presente estudio muestra que el contenido de clorofila fue estimulado cuando *Azolla* se expuso a concentraciones inferiores a  $20 \mu\text{g As mL}^{-1}$ . Por el contrario, el contenido de los carotenoides totales+ xantofilas fue significativamente mayor en las concentraciones menores a  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Esta estimulación de pigmentos fotosintéticos, con excepción de los

carotenoides + xantofilas, también se puede explicar en parte por el efecto estimulante de las concentraciones bajas en el crecimiento del helecho acuático que dio como consecuencia un aumento en la tasa fotosintética (Sakihama *et al.*, 2002; Rudra *et al.*, 2006). No hay información disponible sobre los efectos del arsénico sobre el contenido de carotenoides + xantofilas en estos helechos. Sin embargo, algunos investigadores reportan que *Lemna minor* (lenteja de agua) redujo significativamente el contenido de carotenoides al exponerla a  $25 \mu\text{M Cu L}^{-1}$  (Kanoun-Boule *et al.*, 2009). Esta reducción puede explicarse en parte por los efectos tóxicos de este metal al incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno, y con ello causar la peroxidación de los pigmentos y lípidos de la membrana del cloroplasto (Perales-Vela *et al.*, 2007). Sin embargo, el efecto en el contenido de carotenoides + xantofilas observados por Perales-Vela *et al.* (2007) son opuestos a los del presente estudio con *Azolla*, donde el contenido de carotenoides + xantofilas se estimuló significativamente a medida que las concentraciones de As fueron superiores a  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ , lo cual sugiere mayor investigación.

El estrés provocado en *Azolla* por la presencia de As se midió a través del contenido de fenólicos totales y de la actividad antioxidante total (AOX), los cuales desempeñan un importante papel en la detoxificación de radicales libres que pueden potencialmente causar daño y muerte de las células (Sakihama *et al.*, 2002; Sheng-Gen *et al.*, 2005). El contenido de compuestos fenólicos en el tejido de *Azolla* se estimuló significativamente en presencia de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Se sabe que los compuestos fenólicos tienen actividad antioxidante en condiciones de estrés biótico o abiótico en las plantas. En este estudio se observó que a concentraciones bajas de As el helecho presentó tolerancia al metaloide, y estimulación del crecimiento. Sin embargo, las concentraciones altas de As provocan efectos tóxicos sobre el crecimiento de

*Azolla* lo que puede también estar relacionado con la reducción del contenido de compuestos fenólicos y de la actividad antioxidante total.

Los efectos negativos del As sobre el crecimiento de *Azolla* pueden explicarse en parte debido a la acumulación de este metaloide en el tejido del helecho. En concentraciones bajas de As, *Azolla* acumuló el metaloide en sus tejidos, y mantuvo las condiciones óptimas que contribuyeron en la estimulación de su crecimiento. Sin embargo, la mayor acumulación de As en el tejido del helecho fue medida en las concentraciones altas (60 y 120  $\mu\text{g As mL}^{-1}$ ) lo que resultó en la inhibición del crecimiento.

#### 4.6 CONCLUSIONES

*Azolla filiculoides* tolera concentraciones de arsénico menores a 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

La capacidad de acumulación máxima de arsénico (28  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) en *Azolla filiculoides* se observó al exponerla a 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , induciendo un efecto tóxico manifestado en la inhibición del crecimiento del helecho.

El incremento de la concentración de arsénico ( $> 60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) provocó una disminución significativa en el contenido de clorofila, la actividad antioxidante total, el contenido de compuestos fenólicos totales, pero estimuló el contenido de carotenoides totales + xantofilas.

## CAPÍTULO V

### INFLUENCIA DE LA ACUMULACIÓN DE ARSÉNICO EN LAS CONCENTRACIONES ELEMENTALES EN FRONDAS DE *Azolla filiculoides*

#### RESUMEN

Este estudio determinó la capacidad de acumulación de arsénico y su influencia en las concentraciones de P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu y Zn en las frondas de *Azolla filiculoides*, analizada mediante la técnica de fluorescencia de rayos-X (XRF). El helecho fue expuesto a concentraciones crecientes de arsenato de sodio (0 a 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en la solución nutritiva de Yoshida. Después de 96 h, las frondas se llevaron a peso constante para calcular la tasa relativa de crecimiento (TRC), tasa de duplicación (TD), factor de bioacumulación (FBC), factor de bioabsorción (FBA), y para analizar las concentraciones de los elementos mediante XRF. Conforme incrementó la concentración de As en la solución nutritiva, la TRC y el FBC disminuyeron significativamente, mientras que la TD presentó un comportamiento sigmoideo. *Azolla filiculoides* tuvo la capacidad de tolerar concentraciones menores a 30  $\mu\text{g As mL}^{-1}$ . La acumulación de As en las frondas da como resultado una disminución en las concentraciones de S, K, Ca, Mn, Fe y Zn, mientras que el contenido de P se incrementa. Las concentraciones de Cl y Cu no son afectadas por la acumulación de As en las frondas. Este es uno de los primeros reportes sobre la influencia del As en el crecimiento y acumulación de As en *Azolla filiculoides*, además de que también se reporta el impacto de este metaloide en la concentración elemental en las frondas del helecho.

**Palabras clave:** *Azolla*, *helecho*, *metaloide*, *XRF*.

## CHAPTER V

### INFLUENCE OF THE ACCUMULATION OF ARSENIC ON THE ELEMENTAL CONCENTRATION IN FRONDS OF *Azolla filiculoides*

#### ABSTRACT

This study determined the accumulation of arsenic and its influence on the concentrations of P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu, and Zn in the fronds of *Azolla filiculoides*, analyzed by means of the technique of X-Ray fluorescence (XRF). The fern was exposed Yoshida's nutrient solutions contaminated with increased concentrations of sodium arsenate (0 to 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). After 96 h, the fronds were harvested and oven dried to estimate the relative growth rate (RGR), duplication rate (DT), bioaccumulation factor (BCF), bioabsorption factor (BAF), and to analyze the elemental concentrations by XRF. The RGR and the BCF significantly decreased as the concentrations of As increase in the nutrient solutions, while the TD showed a sigmoidal response. *Azolla filiculoides* tolerate concentrations lower than 30  $\mu\text{g As mL}^{-1}$ . The accumulation of As in the fronds resulted in significant decrease on the content of S, K, Ca, Mn, Fe, and Zn; in contrast the P content was increased. The contents of Cl and Cu in the fronds were not affected due to the accumulation of As. This is one of the first reports about the influence of As on the growth and on the accumulation de As in *Azolla filiculoides*; in addition, it is reported the impact of this metalloid on the elemental concentration in the fronds of this fern.

**Key words:** *Azolla*, fern, metalloid, XRF.

## 5.1 INTRODUCCIÓN

La contaminación por arsénico (As) ha recibido especial atención debido a su alta toxicidad en plantas y en animales, incluyendo al hombre (Zhang *et al.*, 2008), por lo que este problema requiere de acciones inmediatas (Rahman, 2002). Algunos métodos convencionales (floculación, intercambio iónico y oxidación) se han aplicado para la eliminación de As y metales pesados en cuerpos de agua, pero resultan ser de alto costo o poco eficientes (Virender y Sohn, 2009). Las macrófitas acuáticas que crecen en sistemas contaminados poseen mecanismos de acumulación de As y metales pesados (Cd, Pb, Cu, Zn, Cr) en sus tejidos, que les permite tolerar dichos ambientes adversos (Mesjasz-Przylowicz *et al.*, 1999). *Azolla* es un helecho acuático (Carrapico, 2006) que tiene la capacidad de absorber y acumular el As disuelto en el agua. Este metaloide es un anión análogo al fósforo, por lo que tiene una afinidad alta por los transportadores de fosfato de la membrana celular (Rakhshae *et al.*, 2006, Xu *et al.*, 2007). Se ha sugerido que *Azolla* tiene una alta densidad de transportadores de fosfato en la membrana, por lo que puede absorber cantidades altas de arsenato (Zhang *et al.*, 2008). La capacidad de *Azolla* para acumular altas concentraciones de As en sus frondas se atribuye a la formación de complejos con el arsenato mediante la interacción con los grupos tiol de la cisteína, formando así un complejo de bajo peso molecular que se une a iones sulfuro ( $S^{2-}$ ) en el citosol, que es transportado y acumulado en la vacuola (Arora *et al.*, 2005).

La técnica de fluorescencia de rayos-X por dispersión de energía (XRF) ha sido utilizada con éxito en diferentes estudios para la caracterización no destructiva de matrices complejas y heterogéneas. Esta técnica es una alternativa de análisis para muestras biológicas al determinar la concentración multielemental con alta sensibilidad, mínima preparación del espécimen, cuantitativa y no invasiva en muestras o en un espécimen, en comparación con otras formas de análisis rutinarios (Anjos *et al.*, 2002; Vásquez *et al.*, 2003; Gresits y Könczöl, 2003; Gunes *et*

*al.*, 2009). El uso de dispositivos con la capacidad de enfocar el haz de rayos X en regiones específicas de un espécimen permite estudiar la distribución de los elementos en los tejidos y en las diversas estructuras (Tsutsumimoto y Tsuji, 2007; Ruvalcaba-Silet *al.*, 2010). De esta manera es factible determinar alteraciones en elementos vinculados a actividades fisiológicas, micronutrientes y la tolerancia del espécimen a metales pesados o metaloides. Por lo anterior, la aplicación de XRF en sistemas biológicos provee información que permite identificar y cuantificar elementos contaminantes presentes en los tejidos en concentraciones muy bajas ( $\mu\text{g mL}^{-1}$  ó  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), y puede ayudar en un futuro al establecimiento de regulaciones en calidad del suelo y agua para clasificación de residuos y rehabilitación de sistemas acuáticos con propósitos de uso o consumo humano. Por lo tanto, este trabajo se enfoca en particular a evaluar la capacidad del helecho *Azolla filiculoides* para tolerar concentraciones altas de arsénico en sus frondas y mantener el contenido normal de otros iones, aspecto que no ha sido evaluado en detalle.

## **5.2 OBJETIVO**

Evaluar la acumulación de arsénico y determinar su posible relación con la asimilación de fosforo y otros elementos en el helecho *Azolla filiculoides*, mediante la técnica de fluorescencia de rayos X por dispersión de energía.

## **5.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.3.1 Material biológico y establecimiento del experimento**

La colecta de *Azolla filiculoides* se obtuvo del *Azollatum* del Colegio de Postgraduados (Zimmerman *et al.*, 1993). El helecho fue propagado en las mismas condiciones que se reportan en el Capítulo IV, sección 4.3.1.

### 5.3.2 Determinación de la tasa relativa de crecimiento y tasa de duplicación

Después de 96 h, las frondas de *Azolla* se tomaron directamente de la cámara de crecimiento y se enjuagaron con agua desionizada. Las frondas se llevaron a peso constante (70°C durante 48 h) y luego se pesaron para calcular la biomasa seca total.

La tasa relativa de crecimiento (TRC) y la tasa de duplicación (TD) de *Azolla filiculoides* se calcularon a partir de las siguientes ecuaciones (Hoffmann y Poorter, 2002):

$$TRC^1 = (\ln B_2 - \ln B_1) / t$$

Donde:  $\ln B_2$  = Logaritmo natural del peso de la biomasa final (g)

$\ln B_1$  = Logaritmo natural del peso de la biomasa inicial (g)

t = tiempo de crecimiento

$$TD = \ln 2 / TRC$$

Donde:  $\ln 2t$  = Logaritmo natural del tiempo de crecimiento

### 5.3.3 Determinación del factor de bioacumulación y factor de bioabsorción de arsénico y elementos químicos

El factor de bioacumulación (FBC) de As se calculó a partir de los datos de concentración del metaloide disuelto en la solución nutritiva y el acumulado en las frondas de *Azolla*, y que muestra el carácter bioacumulador o bioexclutor de las plantas (Iniesta y Blanco, 2005; González-Mendoza *et al.*, 2007). El factor de bioabsorción (FBA) del As y de los elementos químicos se obtuvo del cociente de la concentración de cada elemento y la concentración del elemento en las frondas de *Azolla* del testigo ( $0 \mu\text{g As mL}^{-1}$ ).

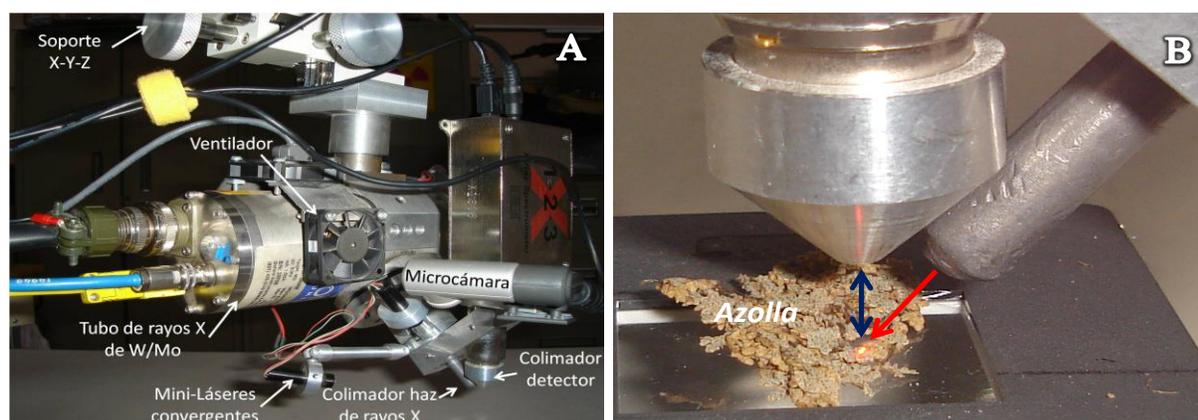
### 5.3.4 Análisis de elementos químicos en frondas de *Azolla*

El análisis de los elementos químicos acumulados en las frondas de *Azolla filiculoides* se llevó a cabo mediante la técnica de fluorescencia de rayos-X (XRF) por dispersión de energía

---

<sup>2</sup>  $B_2 = B_1 e^{TRC(t-t_1)} \therefore TRC = 1/t \ln B_2/B_1 = (\ln B_2 - \ln B_1)/t$

empleando el sistema SANDRA (Sistema de Análisis No Destructivo por Rayos-X) desarrollado en el Instituto de Física de la UNAM, México (Figura 5.1A; Ruvalcaba-Sil *et al.*, 2010). En el sistema SANDRA se dispuso un tubo de rayos-X de Mo ( $17.5 K_{\alpha}$  de keV) de 1.5 mm de diámetro. Los tejidos secos de *A. filiculoides* se colocaron a 8 mm del colimador de salida de rayos-X, y la región y distancia de análisis se determinó por la intersección de dos láseres. El área analizada corresponde a  $1.76 \text{ mm}^2$  de diámetro en las frondas de *Azolla* (Figura 5.1B). El tiempo que duró la irradiación en cada muestra fue de 2 min, tiempo adecuado para determinar con una estadística adecuada (error menor de 5%) en las intensidades de los rayos-X característicos de los elementos detectables por esta técnica (Rousseau *et al.*, 1996; Ruvalcaba-Sil *et al.*, 2010).



**Figura 5.1** Análisis de frondas de *Azolla filiculoides* mediante fluorescencia de rayos-X por dispersión de energía. A) componentes del Sistema SANDRA, B) intersección del haz de rayos-X del tubo de Mo (flecha roja) y el haz de rayos-X elementales (flecha azul) sobre la fronda del helecho.

El proceso de análisis consistió en hacer incidir el haz de rayos-X sobre la superficie de las frondas de *A. filiculoides* provocando que los átomos capaces de absorber los rayos-X, pasen del estado fundamental a estados excitados o de mayor energía debido a la salida de electrones de las capas internas del átomo. Los estados excitados son inestables, y el átomo tiende a volver al estado fundamental, por lo cual se producen transiciones de electrones desde

los niveles más externos hacia los niveles más internos, y ocupar los huecos producidos en las capas electrónicas. Este proceso da lugar a la emisión de energía en forma de radiación de rayos-X secundaria llamada fluorescencia de rayos-X, la cual es característica de cada elemento.

Los rayos-X característicos se midieron con un detector de rayos-X Si-PIN, ventana de 0.5  $\mu\text{m}$  de Be, superficie de 6  $\text{mm}^2$  y espesor de 500 $\mu\text{m}$  de Amptek. Las intensidades de rayos-X (número de cuentas o fotones detectables), son proporcionales a la concentración del elemento en las frondas. Las señales del detector se procesaron en un amplificador PX4 de Amptek conectado a una computadora. Los espectros fueron analizados mediante el programa AXIL (Vekemans *et al.*, 1994) para determinar las intensidades de los picos de rayos-X. Las concentraciones elementales se determinaron siguiendo el modelo descrito por Rousseau *et al.* (1996), Tsutsumimoto y Tsuji (2007), y con base a los espectros de materiales de referencia de hojas de tomate (NIST, SRM, 1573a), liquen (IAEA 482, IAEA 386) y acelga (IAEA 16). El método XRF permitió el análisis puntual total de As, P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu y Zn en la biomasa seca de las frondas de *Azolla filiculoides*.

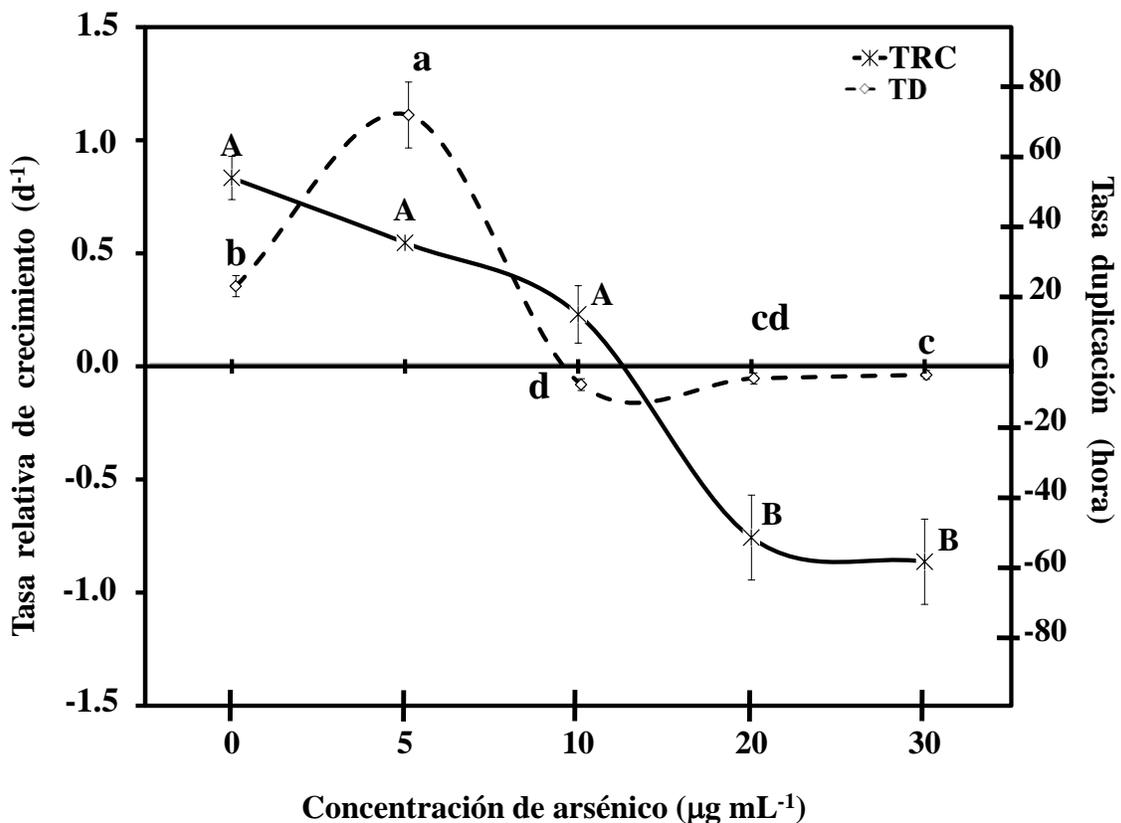
### **5.3.5 Análisis estadístico**

El diseño del experimento fue completamente aleatorio con cinco tratamientos y cuatro repeticiones. La concentración elemental mediante XRF se cuantificó en cuatro puntos diferentes de las frondas de *Azolla*, de cada repetición para cada tratamiento. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el paquete SAS (Institute Inc., 2002), y se realizó una prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) para las variables TRC, TD, FBC, FBA y para la concentración de elementos en frondas. Además, se realizó una prueba de correlación de Pearson entre la concentración de As y los demás elementos. Los valores de cada variable de cada tratamiento se expresan como promedios  $\pm$  desviación estándar.

## 5.4 RESULTADOS

### 5.4.1 Tasa relativa de crecimiento y tasa de duplicación de *Azolla filiculoides*

En la Figura 5.2 se muestra el comportamiento de la TRC y la TD de *Azolla filiculoides* en presencia de As. En ésta se observa que la TRC disminuyó significativamente, mientras que la TD presentó un comportamiento sigmoideal ante el incremento de la concentración de As en la solución nutritiva. La TRC más alta se presentó en el testigo ( $0.83 \text{ d}^{-1}$ ) con TD de 23 h. Ante las concentraciones de 5 y  $10 \mu\text{g As mL}^{-1}$  la TRC fue de 0.55 y  $0.2 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente. En contraste, ante 20 y  $30 \mu\text{g As mL}^{-1}$ , la TRC ( $-0.75$  y  $-0.86 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente) se inhibió significativamente. La TD en la concentración de  $5 \mu\text{g As mL}^{-1}$  fue de 74 h, y se inhibió en 10, 20 y  $30 \mu\text{g As mL}^{-1}$  (-6, -4 y -3 h, respectivamente).



**Figura 5.2** Tasa relativa de crecimiento y tasa de duplicación de *Azolla filiculoides* después de 96 h de exposición a arsénico. Letras mayúsculas/minúsculas iguales indican que no hubo diferencias significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ). Medias  $\pm$  error estándar,  $n=4$ .

#### 5.4.2 Capacidad de bioacumulación y bioabsorción de As y otros elementos químicos en frondas de *Azolla filiculoides*

El Cuadro 5.1 muestra el FBC y el FBA de As y otros elementos en las frondas de *Azolla filiculoides*. El FBC de mayor valor (176) fue ante 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . La exposición a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  provocó disminución del FBC (42%), y continuó disminuyendo (80% y 86%) en las concentraciones más altas de metaloide (20 y 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente). El FBA presentó variaciones dependiendo del elemento y de la concentración de As (Cuadro 5.1). El helecho disminuyó la absorción de S (50%) en las concentraciones más altas (20 y 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Con el incremento de As en la solución nutritiva, el FBA de Zn, K y Mn disminuyó 42%, 59% y 20%, respectivamente. Los FBA más altos de Ca se obtuvieron ante 5 y 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; sin embargo, al incrementar la concentración de As (20 y 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) disminuyó 29%. Al exponer al helecho a 10, 20 y 30  $\mu\text{g As mL}^{-1}$ , el FBA de Fe disminuyó 66%, con respecto al valor obtenido para 5  $\mu\text{g As mL}^{-1}$ . En contraste, el FBA de Cu y Cl presentaron incrementos de 11% y 34% en promedio, en presencia de las concentraciones más altas de As (10, 20 y 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**Cuadro 5.1.** Factor de bioacumulación (FBC) de arsénico y factor de bioabsorción (FBA) de nueve elementos en frondas de *Azolla filiculoides* expuesta a concentraciones crecientes de arsénico.

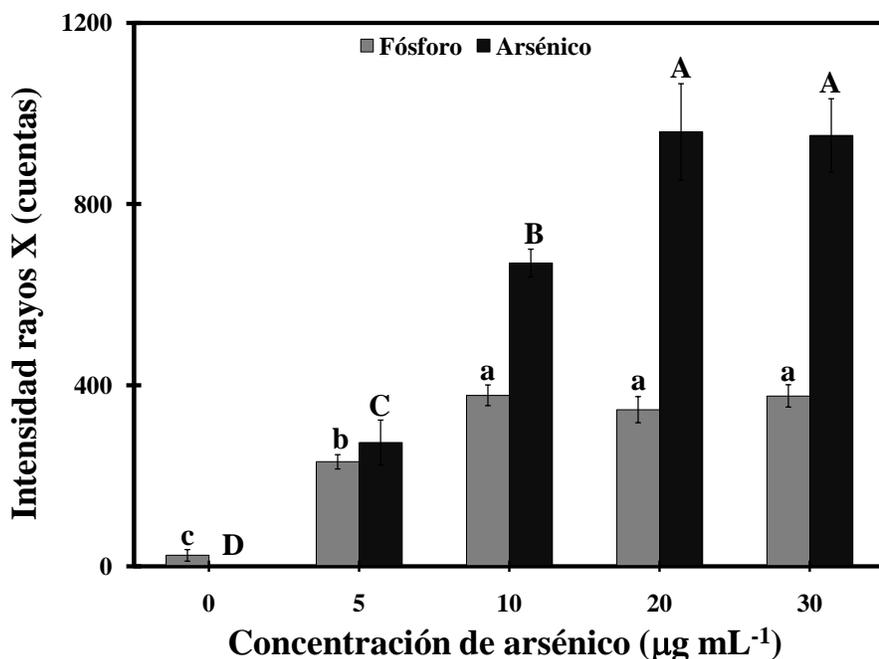
Concentración de As ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	FBC <sup>t</sup>		FBA <sup>tt</sup>						
	As	S	Zn	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Cl
5	176	0.6	0.7	1.6	0.6	0.5	0.6	0.9	0.8
10	102	0.6	0.5	0.9	0.7	0.5	0.2	1.0	1.4
20	35	0.3	0.4	0.5	0.5	0.4	0.2	1.0	1.2
30	23	0.3	0.3	0.4	0.5	0.4	0.2	1.0	1.1

<sup>t</sup>El FBC se determinó del cociente de la concentración de As en las frondas de *Azolla* respecto a la concentración del metaloide en la solución nutritiva.

<sup>tt</sup> El FBA se determinó del cociente de la concentración del elemento en las frondas del helecho de cada concentración expuesta a As y de la concentración del elemento en 0  $\mu\text{g de As mL}^{-1}$ .

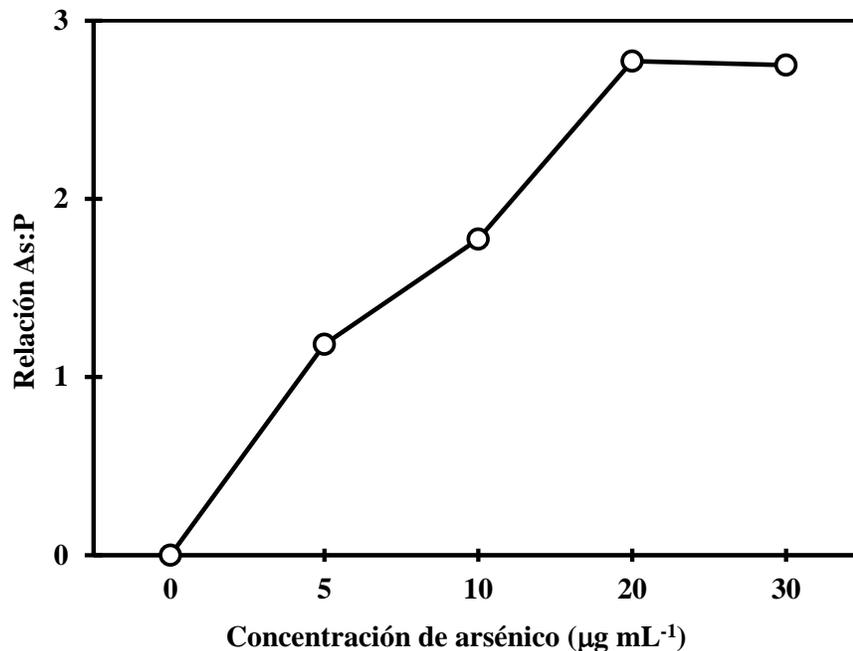
### 5.4.3 Efecto del arsénico en la absorción de fósforo

La Figura 5.3 muestra la concentración de arsénico y fósforo en las frondas de *Azolla filiculoides*. El incremento en la concentración de As en la solución nutritiva tuvo un efecto significativo en la absorción y concentración de P en las frondas de *Azolla filiculoides*. La acumulación del As en las frondas del helecho incrementó conforme el contenido de este metaloide aumentó en la solución nutritiva (Figura 5.3). La mayor acumulación del metaloide se obtuvo ante  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , la cual no mostró diferencias significativas con la concentración más alta ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ante  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  la acumulación de As fue 3 veces menor respecto a 10, 20 y  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ . En el tratamiento testigo fue 9.6 veces menor ante  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , y 16 veces menor ante las tres concentraciones de As restantes. El contenido de P en las frondas de *Azolla* también se incrementó con el incremento del As, pero se estabilizó a partir de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 5.3).



**Figura 5.3** Concentración de arsénico y fósforo en *Azolla filiculoides*, después de 96 h de exposición a diferentes concentraciones de arsénico. Medias  $\pm$  desviación estándar,  $n=4$ . Letras mayúsculas/minúsculas diferentes sobre el mismo color de barra indican diferencias significativas (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

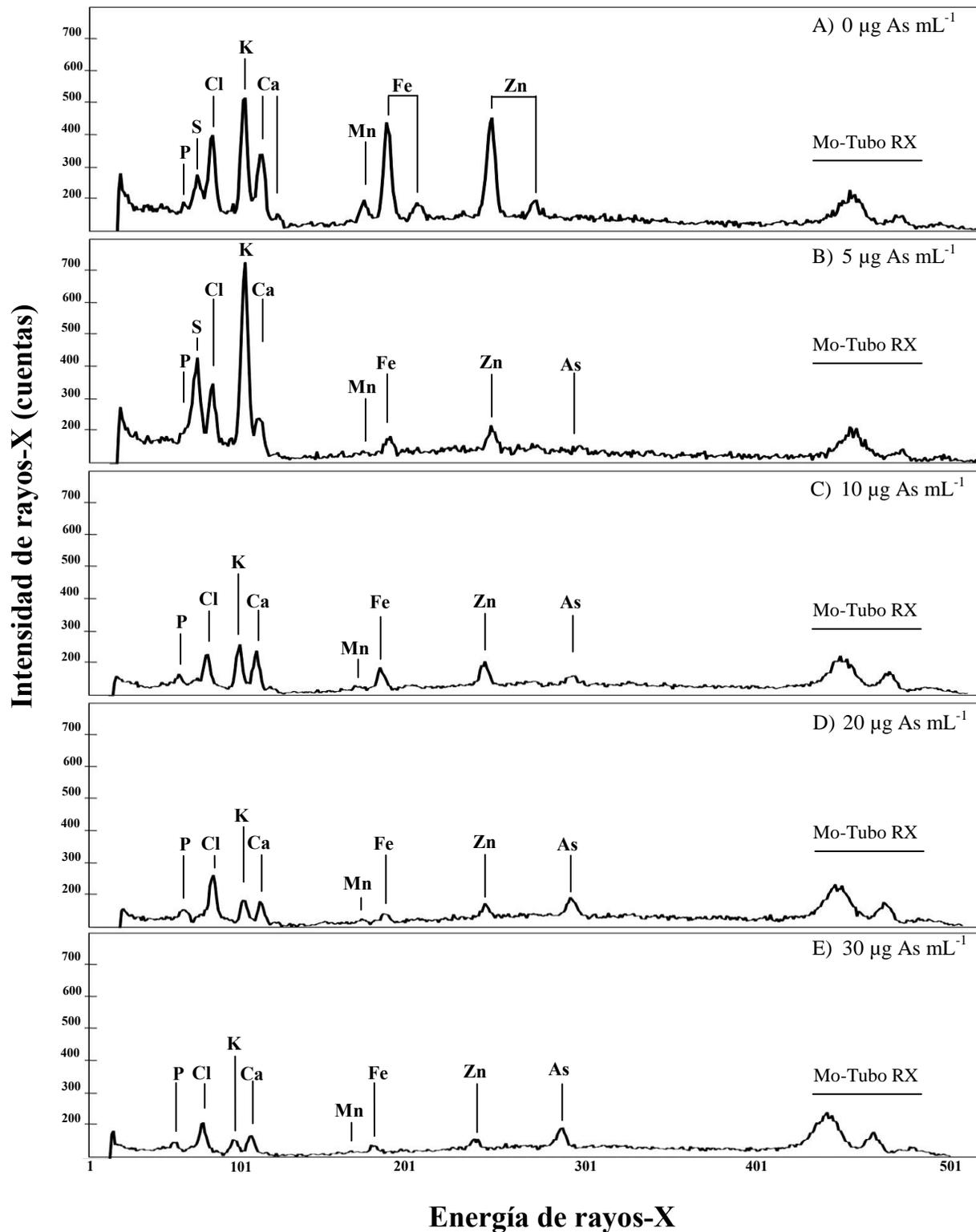
La relación As:P en las frondas del helecho incrementó conforme el contenido del As aumento en la solución nutritiva (Figura 5.4). El análisis de correlación de Pearson ( $r^2 = 0.80$ ) indicó una relación positiva entre As:P en las frondas del helecho. La relación As:P ante 5 y 10  $\mu\text{g As mL}^{-1}$  fue de 1.2:1 y 1.8:1, respectivamente, mientras que para las concentraciones más altas de As (20 y 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), la relación As:P fue de 2.8:1, respectivamente (Figura 5.4).



**Figura 5.4** Relación en concentración de arsénico y fósforo en *Azolla filiculoides*, después de 96 h de exposición a diferentes concentraciones de arsenato de sodio en la solución nutritiva.

#### 5.4.4 Influencia del arsénico en la concentración de otros elementos

La técnica de XRF, además de cuantificar directamente en regiones la concentración específica de As y P en las frondas de *Azolla filiculoides*, midió simultáneamente S, Zn, K, Ca, Mn, Fe, Cu y Cl. La Figura 5.5 muestra los espectros característicos de XRF de las frondas del helecho, se observa que al incrementar la concentración del metaloide en la solución nutritiva el pico correspondiente al As también incrementó. En contraste, algunos de los picos de los demás elementos disminuyeron con base en el testigo, excepto para 5  $\mu\text{g de As mL}^{-1}$  donde se incrementaron los picos correspondientes de K y S (Figura 5.5).

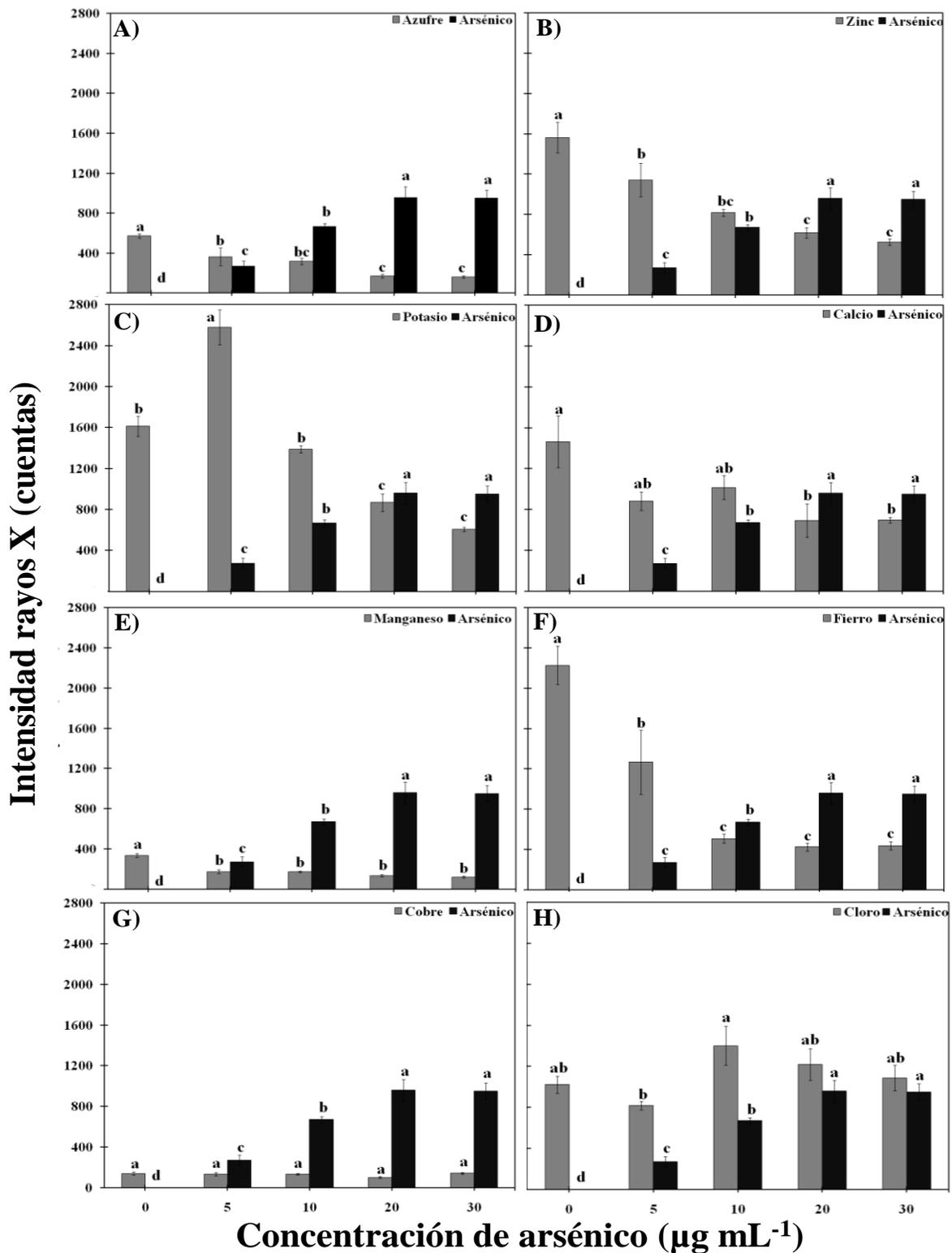


**Figura 5.5** Espectros de frondas de *Azolla filiculoides* expuesta a concentraciones crecientes de arsénico en la solución nutritiva, obtenidos mediante fluorescencia de rayos-X con apoyo de SANDRA.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas en la concentración de algunos elementos dependiendo de la concentración de As en la solución nutritiva (Figura 5.6). El incremento en la concentración de As indujo la disminución en la concentración de S, Zn, K, Ca, Mn y Fe. La concentración de S en las frondas de *Azolla* disminuyó 40% en promedio, ante 5 y 10  $\mu\text{g As mL}^{-1}$  con respecto al testigo, mientras que en las concentraciones más altas (20 y 30  $\mu\text{g As mL}^{-1}$ ), el S disminuyó 71%, en promedio (Figura 5.6A). El Zn presentó la concentración más alta en el testigo; sin embargo, al aumentar la concentración de As (10, 20 y 30  $\mu\text{g As mL}^{-1}$ ) la concentración de Zn disminuyó significativamente (Figura 5.6B).

El contenido de K incrementó significativamente en 37% ante 5  $\mu\text{g As mL}^{-1}$  respecto al testigo, pero disminuyó conforme aumentó la concentración de As (Figura 5.6C). El contenido mayor de Ca se obtuvo en el testigo y disminuyó 35% en promedio ante 5 y 10  $\mu\text{g As mL}^{-1}$  (Figura 5.6D), mientras que ante 20 y 30  $\mu\text{g As mL}^{-1}$  la concentración de Ca disminuyó 52% (Figura 5.6D). Para Mn se obtuvo una disminución significativa al exponer al helecho a todas las concentraciones de As con respecto al testigo (Figura 5.6E). El contenido de Fe disminuyó 43% ante 5  $\mu\text{g As mL}^{-1}$  respecto al testigo, mientras que ante 10, 20 y 30  $\mu\text{g As mL}^{-1}$  la disminución fue de 78% (Figura 5.6F); ante 20 y 30  $\mu\text{g As mL}^{-1}$  la concentración del metaloide en las frondas fue dos veces mayor que el Fe (Figura 5.6F).

El contenido de Cu no presentó diferencias significativas ante todas las concentraciones de As (Figura 5.6G). Sin embargo, el contenido de Cu en 5  $\mu\text{g As mL}^{-1}$  fue dos veces menor al de As, mientras que en las concentraciones más altas del metaloide, el contenido de Cu fue hasta nueve veces menor con respecto al contenido de As (Figura 5.6G). El Cl disminuyó 20% ante 5  $\mu\text{g As mL}^{-1}$  con relación al testigo, mientras que ante las concentraciones de 10, 20 y 30  $\mu\text{g As mL}^{-1}$  no se observaron diferencias significativas con el testigo (Figura 5.6H).



**Figura 5.6** Concentración elemental de frondas de *Azolla filiculoides* expuesta a concentraciones crecientes de arsénico en la solución nutritiva. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar.  $n=4$ . Letras iguales sobre las barras de un mismo color indican que no hay diferencias significativas (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

En el Cuadro 5.2 se presentan los resultados del análisis de correlación de As y de P en el contenido de otros elementos químicos en las frondas de *Azolla*. El As presentó correlación negativa con los elementos S, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu y Zn; mientras que el P la presentó para todos los elementos, excepto con el Cl.

**Cuadro 5.2** Coeficientes de correlación de Pearson ( $r^2$ ) de arsénico y de fósforo con otros elementos en frondas de *Azolla filiculoides*, expuestas durante 96 h arsenato de sodio en la solución nutritiva.

	S	Cl	K	Ca	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn
As	-0.599	0.254	-0.568	-0.323	-0.561	-0.623	-0.283	-0.123	-0.517
P	-0.493	0.359	-0.336	-0.277	-0.623	-0.639	-0.239	-0.099	-0.509

## 5.5 DISCUSIÓN

El As es considerado fitotóxico y tiene un efecto negativo sobre la dinámica de crecimiento de las plantas (Virender y Sohn, 2009). La afectación al crecimiento en *Azolla filiculoides* por exposición a concentraciones crecientes de As se analizó a través de la TRC y la TD. La TRC se define como la ganancia de biomasa por unidad de biomasa y tiempo, y refleja la capacidad competitiva y el comportamiento de una especie ante una condición de estrés biótico o abiótico (Villar *et al.*, 2004). La TRC de *Azolla filiculoides* en condiciones normales ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) fue  $0.8 \text{ d}^{-1}$  (Figura 5.2), siendo este valor superior a las TRC ( $0.2$  y  $0.14 \text{ d}^{-1}$ ) reportadas para diferentes colectas de *Azolla* en condiciones normales de crecimiento (Navas *et al.*, 2006; Espinoza, 2004). Cuando la  $\text{TRC} > 0$  se dice que el crecimiento es exponencial; por el contrario, cuando la  $\text{TRC} < 0$  se habla de declinación exponencial (Espinoza y Gutiérrez, 2003). En la Figura 5.2 se muestra que ante la concentración más baja del metaloide ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) el crecimiento del helecho disminuyó (38%), en comparación con el

testigo ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ante  $10 \mu\text{g As mL}^{-1}$  el helecho disminuyó aún más su crecimiento (75%), pero mantuvo alto contenido de pigmentos fotosintéticos, mayor actividad antioxidante total y compuestos fenólicos (Ver Capítulo IV, sección 4.4.1 y 4.4.2), lo que le permitió tolerar las condiciones de estrés por As. En contraste, al exponer al helecho a concentraciones altas de As ( $20$  y  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) el crecimiento se inhibió ( $-0.8$  y  $-0.9 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente), tal como se muestra en la Figura 5.2. Resultados similares han sido reportados por Zhang *et al.* (2008), al exponer durante cinco días a *Azolla filiculoides* a  $13 \mu\text{g As mL}^{-1}$  encontraron que la TRC disminuyó 50%.

La TD es el periodo que requiere una población para duplicar su biomasa, y es una forma aproximada de estimar la rapidez en crecimiento (Villar *et al.*, 2004). La TD de *Azolla filiculoides* en el testigo ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) fue de 23 h (Figura 5.2), siendo este valor superior a las TD (58 y 72 h) de *Azolla filiculoides* reportada por Navas *et al.* (2006) y Espinoza (2004), en condiciones nutricionales adecuadas para el crecimiento. Ante la concentración más baja del metaloide ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) la TD de biomasa incrementó (64%), en comparación con el testigo. Mientras que ante concentraciones altas de As ( $10$ ,  $20$  y  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) la TD se inhibió.

La exposición de *Azolla filiculoides* a  $30 \mu\text{g As mL}^{-1}$  en la solución nutritiva indujo síntomas de toxicidad, al presentar clorosis y necrosis en los márgenes de las frondas del helecho (Ver Capítulo VIII, sección 8.4.1). El crecimiento es un factor importante para la evaluación de la eficiencia de un proceso de fitoextracción ya que la evaluación al incremento o la inhibición del crecimiento en una planta puede ser utilizada como indicador del efecto que tiene una cierta concentración de un contaminante (Singh *et al.*, 2006). Los resultados de esta investigación representan la evidencia de que *Azolla filiculoides* mantiene una estrecha relación entre crecimiento y tolerancia al As, de forma que la energía que el helecho dedica a sintetizar compuestos antioxidantes y mantener sus actividades fotosintéticas ante condiciones

de contaminación por As es a costa de un menor crecimiento. Lo anterior representa una ventaja ecológica de *Azolla* ya que consigue mantener activo su sistema fotosintético, captar recursos (luz, agua, nutrimentos) y le confiere mayor capacidad competitiva (Cao *et al.*, 2010).

Iniesta y Blanco (2005) mencionaron que si el FBC  $>1$ , la translocación del elemento hacia la planta es mayor que la concentración del contaminante que se encuentra soluble. Lo contrario ocurre cuando el FBC  $<1$ , es decir, la translocación del metal es menor o inclusive insignificante si se compara con la concentración del elemento en la solución. El patrón de acumulación de As por *Azolla filiculoides* tuvo la tendencia de disminuir conforme la concentración de As aumentó en la solución nutritiva. Sin embargo, todos los valores del FBC fueron superiores a 1 (Cuadro 5.1). Bajo este contexto, se puede predecir una alta eficiencia de *A. filiculoides* durante el proceso de fitoextracción de As en agua con concentraciones por encima del límite permisible ( $0.025 \text{ mg L}^{-1}$ ), como lo indica la NOM-127SSA1-994.

Los valores obtenidos del FBC sugieren que *Azolla filiculoides* tiene un mecanismo activo excepcional para bioabsorber y bioacumular As (Cuadro 5.1). Esta capacidad del helecho de acumular cantidades extraordinarias de As acompañada por el incremento en biomasa es una característica indispensable para las plantas que se utilizan en técnicas de fitoextracción (Gardea-Torresdey *et al.*, 2004). Aun cuando el FBC disminuyó en concentraciones altas, el helecho mantuvo valores superiores a 1 en sus frondas. Los valores altos del FBC (23-35) ante altas concentraciones de As son evidencia de que las frondas de *A. filiculoides* son una estructura importante de acumulación de As, y están equipadas con un eficiente sistema de absorción del metaloide. Cai *et al.* (2004) demostraron que la acumulación de As en el helecho *Pteris vittata* se debe a la inducción de la síntesis de fitoquelatinas, las cuales enlazan al As por su grupo funcional  $-SH$  y favorecen los incrementos en acumulación del metaloide, además de tener un papel importante en la

tolerancia a metales pesados. La síntesis de fitoquelatinas no se determinó en esta investigación, por lo que es necesario realizar estudios para elucidar si *Azolla filiculoides* produce estos compuestos en condiciones de contaminación con As.

*Azolla filiculoides* mostró una relación significativa negativa entre el contenido de P y As en las frondas conforme la concentración de As incrementó en la solución nutritiva (Figura 5.3). El arsenato es un anión análogo al fosfato, ya que utiliza el mismo sistema de transporte en la membrana, por lo que la acumulación de As está íntimamente relacionada con la nutrición de P (Ullrich-Eberius *et al.*, 1989; González *et al.*, 2005). Villa-Bellosta *et al.* (2006) reportaron que los transportadores de P se inhiben en concentraciones de 1.5-5 mM de As debido a que ambos elementos tienen el mismo potencial de ionización (pKs). Por su parte, Meharg y Macnair (1992) mencionan que la acumulación de As en los helechos puede ser atribuida a que éstos acumulan altos niveles de arsenato en un intento por obtener el fosfato, lo que implica la activación de mecanismos de desintoxicación del arsénico, a través de la síntesis de fitoquelatinas que se unen al metaloide con gran afinidad y favorecer su acumulación (Zhang *et al.*, 2002; Vetterlein *et al.*, 2009).

La relación de absorción mínima de As:P en helechos que son tolerantes al metaloide ha sido establecida de 2:1, lo cual asegura su crecimiento normal (Meharg, 2003). El presente trabajo muestra que la relación As:P en las frondas de *Azolla* incrementó desde 1:1 hasta 2.8:1, conforme aumentó la concentración del metaloide en la solución (Figura 5.4). Este incremento en la relación As:P sugiere que *Azolla filiculoides* cuenta con un mecanismo de acumulación del metaloide que incluye a la vez la asimilación de P. Resultados similares son reportados para *Pteris vittata* (hiperacumulador de As) al mantener una relación de absorción As:P de 2:1 después de 10 h de exposición a concentraciones de 13.5  $\mu\text{g As mL}^{-1}$  (Singh *et al.*, 2006).

El As induce estrés oxidativo en helechos acuáticos, al generar especies reactivas de oxígeno, lo que provoca reajustes en los procesos de transporte de los elementos y metabolismo (Sela *et al.*, 1989). Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que el incremento en la concentración de As en la solución modificó la composición elemental y concentración de S, Zn, K, Ca, Mn, y Fe en las frondas de *Azolla filiculoides* (Figura 5.5). La concentración de S disminuyó significativamente en 5  $\mu\text{g}$  de As  $\text{mL}^{-1}$  (Figura 5.5A). La acumulación de As implica la activación de mecanismos de detoxificación, como la síntesis de grupos tiol y fitoquelatinas que se unen al metaloide con gran afinidad y favorecen su acumulación (Zhang *et al.*, 2002). La síntesis de grupos tiol y fitoquelatinas a partir del glutatión está muy relacionada con la concentración de S (Zhang *et al.*, 2010). Ante las diferentes concentraciones de As (5, 10, 20 y 30  $\mu\text{g}$   $\text{mL}^{-1}$ ) la concentración de S disminuyó. Lo anterior pudo haber estado relacionado con el incremento en la demanda de S para formación de grupos tiol que enlazan al metaloide por su grupo  $-\text{SH}$  y favorecen la absorción y transporte del As de la raíz a las frondas de *Azolla filiculoides* (Figura 5.5A), y a que el glutatión demanda el S para la síntesis de fitoquelatinas, y la reducción del arsenato a arsenito (Duan *et al.*, 2007).

En el caso del Zn se observó una disminución desde 27% ante 5  $\mu\text{g}$  As  $\text{mL}^{-1}$ , hasta 66% en las concentraciones más altas de As (Figura 5.5B). Este efecto puede en parte explicar la inhibición del crecimiento de *Azolla* mencionado en párrafos anteriores, ya que el Zn se requiere en la síntesis del ácido indol-3 acético a partir del triptófano (actividad auxínica), el cual es importante para regular el crecimiento del helecho (Feldman-Salit *et al.*, 2009). Además, el Zn es activador de la síntesis de metaloenzimas e isoenzimas como la superóxido dismutasa, que desempeñan un papel importante en la eliminación de radicales superóxido, y con ello proteger las membranas y las proteínas contra la oxidación (Cai *et al.*, 2004; Küpper

*et al.*, 2009; Feldman-Salit *et al.*, 2009). Algunas investigaciones, mencionan que, el Zn está involucrado en mantener la integridad de la membrana, la fijación fotosintética de CO<sub>2</sub>, la transferencia de fotosintatos de los cloroplastos hacia el citoplasma, y dentro del citoplasma controla también el flujo de metabolitos vía procesos glicolíticos (Jing *et al.*, 2010).

La concentración de K aumentó 37% ante 5 µg As mL<sup>-1</sup>, y ante concentraciones altas (20 y 30 µg mL<sup>-1</sup>) disminuyó 54%, con respecto al testigo (Figura 5.5C). El comportamiento anterior, puede ser debido a que *Azolla filiculoides* en concentraciones bajas de As (5 y 10 µg As mL<sup>-1</sup>) pudo haber incrementado la concentración intracelular de K y otros elementos como mecanismo de defensa para mantener el crecimiento, la división celular, y la síntesis de proteínas (Meagher y Vassiliadis, 2005). En contraste, la exposición del helecho a concentraciones altas del metaloide (20 y 30 µg As mL<sup>-1</sup>) indujo la disminución en el contenido de K, que puede ser debido a la afectación en el flujo de K al interior de la célula mediado por la ATPasa, y que explicaría a la vez los síntomas de toxicidad (clorosis, necrosis, inhibición del crecimiento y duplicación) por el metaloide observados en *Azolla filiculoides* (Singh *et al.*, 2006). Además, las concentraciones altas de As pueden haber afectado directamente los procesos metabólicos, debido al aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno que rompen los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados y los fosfolípidos de la membrana, que llevó a la pérdida de K (Cakmak, 2000).

La concentración de Ca disminuyó al exponer a *Azolla* a concentraciones crecientes de As (Figura 5.5D). Estos resultados pueden atribuirse a que el As induce cambios en la estructura de las proteínas que activan los canales transportadores de Ca de la pared celular y en la estabilización de la integridad celular (Smith *et al.*, 2002; Ventura *et al.*, 2006). Las plantas bajo condiciones de estrés abiótico forman cristales de oxalato de Ca como acción protectora (Kachenko *et al.*, 2010), por lo que al detectar disminución en la concentración de

Ca en las frondas del helecho, abre una línea de investigación sobre el papel del Ca en las macrófitas acuáticas que crecen en ambientes contaminados.

La concentración de Mn disminuyó 56% en promedio, en las frondas de *Azolla filiculoides* al incrementar la concentración de As en comparación con el testigo (Figura 5.5E), lo cual sugiere que el As tiene un importante papel en la asimilación y acumulación de este elemento. La disminución en el contenido de Mn en *Azolla filiculoides* pudo haber inducido la disminución en contenido de clorofila y la clorosis observada (Ver Capítulo IV, sección 4.4.1), ya que participa en reacciones de la fotosíntesis, formando parte de las proteínas responsables de la fotólisis del agua y producción de O<sub>2</sub> (Pittman, 2007). La homeostasis de Mn intracelular está fuertemente mediada por el contenido de Fe y Zn (Shi *et al.*, 2010). Por ejemplo, las plantas de *Commelina communis* en condiciones de estrés inducido por As, presentan competencia del Mn por los mismos canales transportadores de iones divalentes como Zn, Fe y Ca, lo que inhibe su asimilación y su acumulación (Shi *et al.*, 2010).

El incremento de As en la solución nutritiva indujo disminución (43% a 80%) en la concentración de Fe en las frondas (Figura 5.5F). Esto puede estar afectando inicialmente las funciones principales del Fe, como es el desarrollo y el funcionamiento de los cloroplastos, ya que el 80% del elemento está localizado en cloroplasto. Por tanto, la disminución de Fe, puede estar afectando principalmente la producción de ferridoxina (proteína Fe-S) que es el primer compuesto redox estable en la cadena de transporte de electrones durante la fotosíntesis (Zhao *et al.*, 2002a; Tu *et al.*, 2003). Además, la disminución en la concentración de Fe puede estar afectando la fijación de nitrógeno por el cianobionte *Anabaena azollae*. El Fe forma parte del complejo enzimático nitrogenasa, enzima esencial en la fijación de N<sub>2</sub> (Kneip *et al.*, 2007; Ran *et al.*, 2010). Las diferentes concentraciones de As no modificaron la concentración de Cu (Figura 5.5G), no así para el Cl, el cual disminuyó 20% ante 5 µg As mL<sup>-1</sup>, y se incrementó en

las concentraciones más altas del metaloide (Figura 5.5H). Ambos elementos participan en las reacciones fotoquímicas, en la eficiencia del fotosistema II, y en la activación del fraccionamiento de la molécula de agua (Sato *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008), aspecto que es necesario sea estudiado más a detalle.

## 5.6 CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio son uno de los primeros reportes que se enfocan a evaluar no sólo la influencia del As en el crecimiento de *Azolla filiculoides*, sino también en la evaluación del efecto del As en las concentraciones de fósforo y otros elementos en el helecho.

Los datos de este capítulo son congruentes a los obtenidos en el Capítulo IV de esta investigación, y confirman que *A. filiculoides* tiene la capacidad de acumular As y estimular su crecimiento a bajas concentraciones de As denotando su tolerancia a este metaloide.

Aun cuando la técnica de fluorescencia de rayos-X por dispersión de energía no es una herramienta tradicional para el análisis de materiales biológicos; mostró ser una técnica versátil, multielemental, rápida y no invasiva para determinar de manera eficaz la concentración de As y otros elementos esenciales en las frondas de *A. filiculoides*, y representa una alternativa para el establecimiento de regulaciones de contenido de metaloides y metales de agua en sistemas presumiblemente rehabilitados y con propósitos de consumo humano.

La técnica de fluorescencia de rayos-X por dispersión de energía permitió determinar que el incremento en la concentración de As en la solución nutritiva disminuyó el contenido de S, K, Mn, Fe y Zn causando desbalances en la concentración elemental de las frondas de *A. filiculoides*. Además de establecer que la capacidad de acumulación de As en frondas de *Azolla filiculoides* está estrechamente relacionada con el incremento en la asimilación de fósforo.

## CAPÍTULO VI

### EFFECTO DEL COBRE EN LA FLUORESCENCIA DE CLOROFILA Y PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA DE *Azolla filiculoides* Y *Azolla caroliniana*\*

#### RESUMEN

Se evaluó el efecto tóxico del cobre sobre la actividad fotosintética y la estabilidad de la membrana celular de dos especies de *Azolla* a través de la fluorescencia de la clorofila, la fuga de electrolitos, y el contenido de compuestos fenólicos totales. Las colectas de *Azolla filiculoides* (XAL y ENS) y *Azolla caroliniana* (CEG) se incubaron en concentraciones crecientes de  $\text{Cu}^{2+}$  (0.02, 0.2, 1 y 2 mM) durante 36 h, en condiciones controladas de cámara de crecimiento. Los resultados mostraron que las concentraciones más altas de Cu (1 y 2 mM) afectan significativamente el fotosistema II, al reducir el rendimiento fotoquímico (Fv/Fm) en comparación con el testigo. Después de 12 h de exposición, la permeabilidad de la membrana (fuga de electrolitos) de ambas especies aumentó significativamente al incrementar la concentración de Cu en la solución nutritiva. A las 36 h, el contenido de compuestos fenólicos totales en ambas especies de *Azolla* no se vio afectado significativamente en las diferentes concentraciones de Cu, excepto en la dosis más baja (0.02 mM), en la cual aumentó. El análisis de fluorescencia de la clorofila puede ser un indicador de los cambios fisiológicos que tienen lugar en los helechos de *Azolla* durante las primeras etapas de exposición ante contaminación con Cu.

**Palabras clave:** *Actividad fotosintética, Azolla, electrolitos, fotosistema II, sulfato de cobre.*

\*Este capítulo resultó en la publicación del artículo científico en la revista International Journal of Agriculture & Biology, factor de impacto 0.0365 (Anexo IV).

## CHAPTER VI

### COPPER EFFECTS ON THE CHLOROPHYLL FLOURESENCE AND MEMBRANE PERMEABILITY OF *Azolla filiculoides* AND *Azolla caroliniana*

#### ABSTRACT

The toxic effects of copper on the photosynthetic activity and the membrane stability of two species of *Azolla* were evaluated by means of measuring the chlorophyll fluorescence, electrolyte leak, and the total content of phenolic compounds. The collects of *Azolla filiculoides* (XAL and ENS) and *Azolla caroliniana* (CEG) were incubated under increased concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  (0.02, 0.2, 1 and 2 mM) for 36 h, under plant growth chamber conditions. Results showed that high concentrations of Cu (1 and 2 mM) significantly affected the photosystem II by reducing the photochemical yield (Fv/Fm) when compared to the control. After 12 h, the membrane permeability (electrolyte leak) in both *Azolla* species significantly enhanced as the Cu concentration increased in the nutrient solution. At 36 h the total content of phenolic compounds was not significantly due to increased concentrations of Cu affected in both *Azolla* species, but at the lower concentration (0.02 mM) the total phenolic content increased. The chlorophyll fluorescence may be used as an indicator for physiological changes of *Azolla* ferns at early stages of growth under Cu contamination.

**Key words:** *Azolla*, copper sulphate, electrolytes, photosynthetic activity, photosystem II.

## 6.1 INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo las aguas residuales no tratadas provenientes de la extracción minera, refinamiento de productos mineros y efluentes industriales son desechadas a la corriente de los ríos provocando la contaminación de las aguas superficiales y subterráneas. El contenido de metales se suele evaluar comúnmente en las efluentes industriales debido a su persistencia (Johnston *et al.*, 2009). El cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) es un micronutriente esencial para las plantas que se puede encontrar en concentraciones de hasta  $35,900 \text{ mg kg}^{-1}$  en los ecosistemas acuáticos (Chen *et al.*, 2007; Rauf *et al.*, 2009). El Cu se ha convertido en un contaminante debido al incremento de su uso como plaguicida en la agricultura (Ahmad *et al.*, 2008). El límite permisible a  $2 \text{ mg Cu L}^{-1}$  en el agua potable ayuda a evitar problemas y también previene el sabor del cobre (Pankit y Bhave, 2002). Sin embargo, las concentraciones que se aproximan a  $1 \text{ mg Cu L}^{-1}$  pueden ser tóxicas para peces, en consecuencia, el Cu tiende a ser un peligro ambiental, y más aún para la salud humana (Brooks, 1988). Estudios previos han demostrado la existencia de contaminación por Cu de cuerpos de agua en México, ejemplo de ello es el Río Haydy en el Valle de Mexicali, localizado al noreste de Baja California, al sur del Valle Imperial en California. El Río Hardy recibe residuos con concentraciones elevadas de metales pesados de la planta de energía geotérmica de Cerro Prieto, ubicado en el centro del valle agrícola, aproximadamente 30 km al sur de la ciudad de Mexicali (Villanueva y Botello, 1998; Shumilin *et al.*, 2000).

Algunas plantas han mostrado tener la capacidad de acumular metales pesados y otros contaminantes al desarrollarse en aguas contaminadas, y pueden ser utilizadas en los procesos de fitorremediación (Mkandawire *et al.*, 2004). Sin embargo, la elección de especies de plantas para la eliminación de los iones metálicos del agua contaminada depende de su tasa de crecimiento, de su tolerancia a los metales pesados, de la cantidad de biomasa producida y

de la concentración de los metales en el ambiente (Garvisu *et al.*, 2002). *Azolla* es un helecho ampliamente distribuido en todo el mundo que crece en aguas dulces y aguas residuales (Carrapico, 2006). Se ha reportado que este helecho acuático tiene la capacidad de destoxificar ambientes acuáticos contaminados con metales pesados y metaloides (Khosravi *et al.*, 2005; Rai *et al.*, 2009). Sin embargo, a pesar de que se sabe que algunos metales se acumulan en las frondas de algunas especies de *Azolla*, la tolerancia y las respuestas fisiológicas en especies nativas de México no han sido estudiadas.

## **6.2 OBJETIVO**

Evaluar el efecto tóxico del cobre sobre el fotosistema II, la permeabilidad de la membrana celular, y los compuestos fenólicos totales como posibles indicadores del estrés del cobre en dos especies de *Azolla*.

## **6.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.3.1 Material biológico y condiciones experimentales**

Se utilizaron las colectas de *Azolla filiculoides* (XAL y ENS) y *A. caroliniana* (CEG). Frondas frescas (1 g) de las especies de *Azolla* se colocaron en recipientes de plástico con 150 mL de solución nutritiva de Yoshida (Anexo I; Yoshida *et al.*, 1971). El pH inicial de la solución nutritiva fue de 5.5 y la conductividad eléctrica de  $876 \mu\text{S m}^{-1}$ . Se aplicó una serie de concentraciones de  $\text{CuSO}_4$  en la solución nutritiva (0.02, 0.2, 1 y 2 mM), y se utilizó solución nutritiva sin contaminar como testigo; cada concentración tuvo tres repeticiones para cada colecta de *Azolla*. El experimento se mantuvo durante 36 h en condiciones controladas de cámara de crecimiento (26°C, fotoperiodo de 12 h, y 80% humedad relativa; Lab-Line Biotronette, Mark IV, modelo 849-6 US).

### **6.3.2 Estimación de la permeabilidad de la membrana (fuga de electrolitos)**

La estimación de la estabilidad de la membrana cuantificada a través de la fuga de electrolitos se determinó con un conductímetro TESTER CE/TDS/pH HI98311 USA), como lo describe González-Mendoza *et al.* (2009). La conductividad eléctrica inicial ( $CE_1$ ) se midió en la solución nutritiva de *Azolla*. A continuación, la conductividad eléctrica ( $CE_n$ ) se midió a las 12, 24 y 36 h, respectivamente. Finalmente, se midió la conductividad eléctrica final ( $CE_F$ ) después de enfriar ( $25^\circ\text{C}$ ) y colocar las muestras en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 20 min para liberar todos los electrolitos. La fuga de electrolitos ( $E_T$ ) se calculó con la ecuación:

$$E_T = [(CE_n - CE_1)/CE_F] \times 100.$$

### **6.3.3 Fluorescencia de clorofila**

La fluorescencia de la clorofila se midió en frondas de *Azolla in-vivo* con el equipo portátil “Plant Efficiency Analyser” (PEA) de Hansatech Instruments Ltd., UK. El área de la fronda fue iluminada con un pico de emisión de 650 nm de longitud de onda por los 6 LEDs (diodos emisores de luz roja) montados en el soporte cilíndrico del sensor del PEA, de unos 4 mm de diámetro. Las frondas seleccionadas al azar fueron sometidas a un período de 5 min de adaptación a la oscuridad para inducir la oxidación completa de los centros de reacción. La fluorescencia de clorofila se midió a las 0, 12, 24 y 36 h de exposición al cobre. La eficiencia máxima fotoquímica potencial del fotosistema II tras adaptación a la oscuridad ( $F_v/F_m$ ) se calculó según el método de Strasser *et al.* (1995) y Küpper *et al.* (2002).

### **6.3.4 Determinación de compuestos fenólicos**

El contenido de compuestos fenólicos totales de las colectas de *Azolla* expuestas a cobre se evaluó a las 36 h, por el ensayo con el reactivo de Folin-Ciocalteu, utilizando el ácido clorogénico como estándar (Soong y Barlow, 2004). Las frondas (100 mg) fueron maceradas con 1.5 mL de metanol 80% a  $4^\circ\text{C}$ , y se centrifugaron ( $14000 \times g$ ) durante 15 min. La mezcla

de reacción consistió en 30  $\mu\text{L}$  del extracto con 90  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 150  $\mu\text{L}$  de reactivo Folin-Ciocalteu en una microplaca de 96 pozos. Después de 30 minutos, la lectura de absorbancia (725 nm) fue tomada en un espectrofotómetro (Biotek 2 Instruments, Inc. Winooski, Vt.).

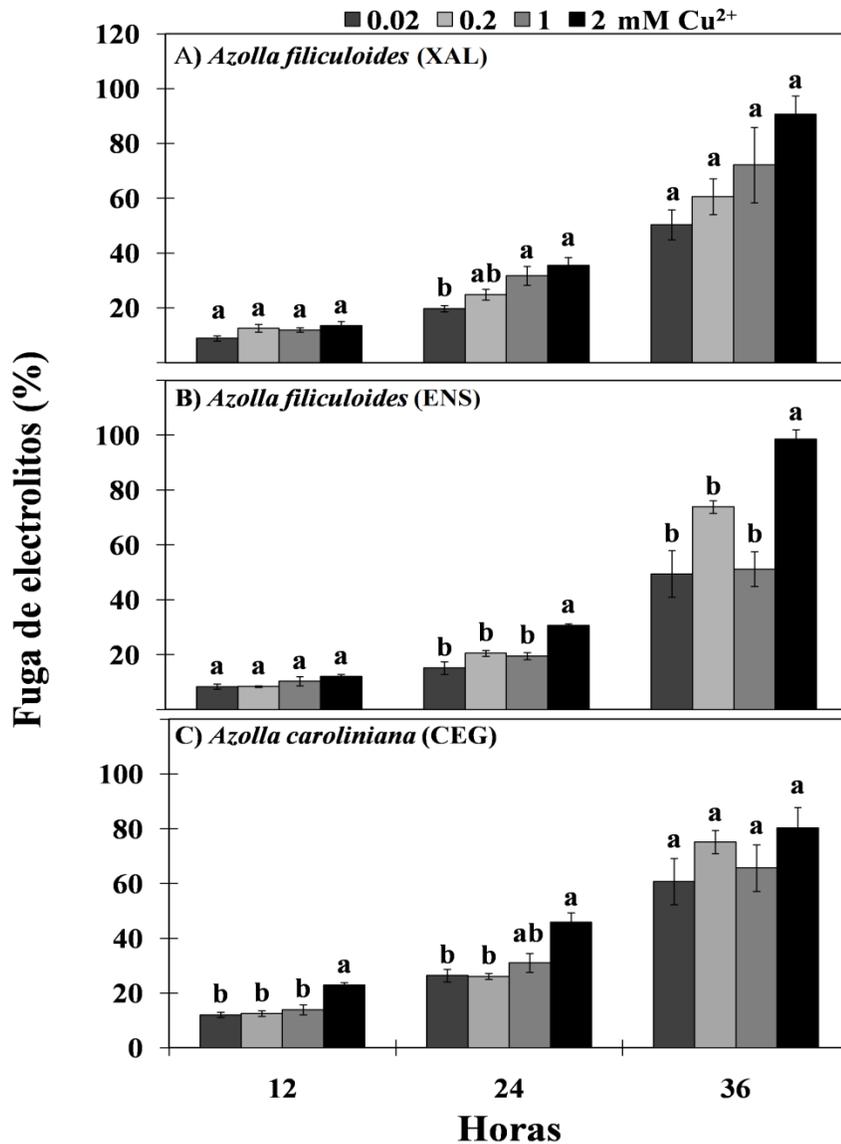
### 6.3.5 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar, con cinco tratamientos con tres repeticiones cada uno. Los datos fueron analizados como factorial para cada colecta de *Azolla* mediante un ANOVA y una prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) para las variables fuga de electrolitos, fluorescencia de clorofila y compuestos fenólicos mediante el paquete estadístico Statistical Package versión 5.5 (Statsoft, USA). Los valores de cada variable de cada tratamiento se expresan como promedios  $\pm$  desviación estándar.

## 6.4 RESULTADOS

### 6.4.1 Permeabilidad de la membrana de *Azolla*

Las concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$  tuvieron un efecto negativo en la permeabilidad de la membrana de las frondas de *Azolla* al incrementar la fuga de electrolitos (Figura 6.1). Después de 12 h de exposición, *Azolla filiculoides* (XAL y ENS) no presentó diferencias significativas en la fuga de electrolitos (Figura 6.1A, B). Para *Azolla caroliniana* (CEG) en la concentración de 2 mM incrementó significativamente la fuga de electrolitos, en comparación con las demás concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$  (Figura 6.1C). A las 24 h de la exposición a  $\text{Cu}^{2+}$  las tres colectas de *Azolla* incrementaron significativamente la fuga de electrolitos en la concentración de 2 mM, en comparación al testigo (Figura 6.1A, B y C). A las 36 h de exposición a  $\text{Cu}^{2+}$ , la fuga de electrolitos se incrementó en las tres colectas, siendo significativamente mayor en *Azolla filiculoides* (ENS) que en *Azolla caroliniana* (Figura 6.1).

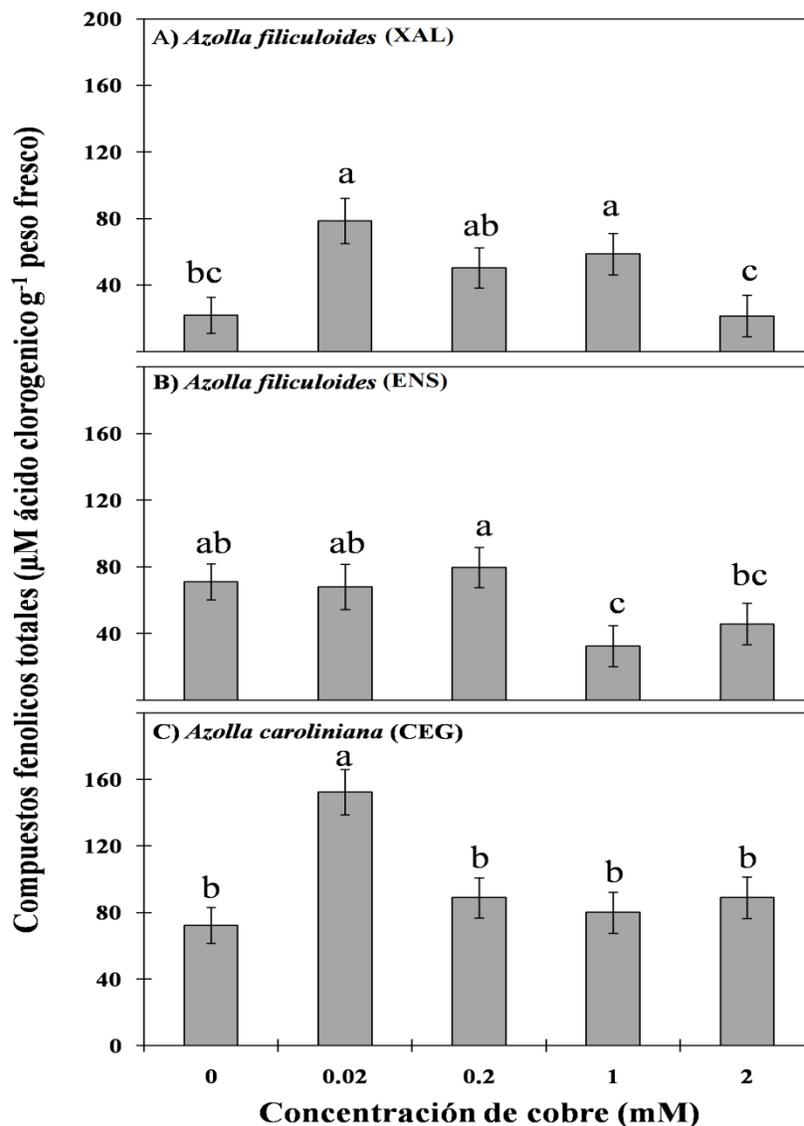


**Figura 6.1** Porcentaje de fuga de electrolitos medido en frondas de tres colectas de *Azolla* expuestas a 0.02, 0.2, 1, 2 mM  $\text{Cu}^{2+}$ . Medias  $\pm$  error estándar, n=3. Letras diferentes sobre las barras a igual tiempo y para cada colecta, indican que hubo diferencias significativas entre tratamientos (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

#### 6.4.2 Compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales de las frondas de *Azolla* se muestra en la Figura 6.2. Los compuestos fenólicos totales presentaron diferencias significativas entre colectas de *Azolla* con y sin  $\text{Cu}^{2+}$  en la solución nutritiva. Después de 36 h de exposición a

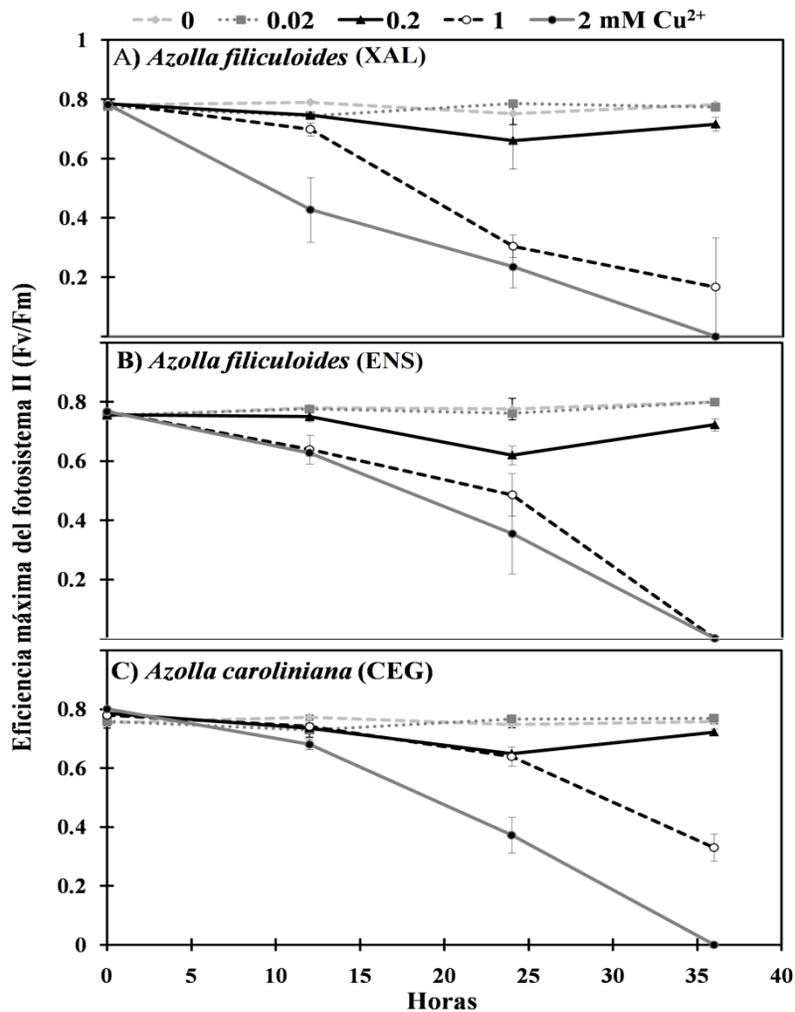
Cu<sup>2+</sup> se cuantificó 80.0±0.3 µM de compuestos fenólicos totales en *Azolla* (ENS y CEG), y sólo 35.0±0.05 µM en *Azolla* (XAL). *Azolla filiculoides* (ENS y Xalapa) no mostraron diferencias significativas en el contenido de compuestos fenólicos totales, excepto en la concentración más alta (2 mM) donde disminuyó significativamente (Figura 6.2A, B). Por su parte, en *Azolla caroliniana* (CEG) el contenido de compuestos fenólicos totales fue significativamente mayor ante la concentración más alta de Cu<sup>2+</sup> (2 mM; Figura 6.2C).



**Figura 6.2** Compuestos fenólicos soluble totales en tres colectas de *Azolla* expuestas a 0.02, 0.2, 1, 2 mM Cu<sup>2+</sup> durante 36 h. Medias± error estándar. n=6. Letras diferentes sobre las barras para cada colecta, indican que hubo diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, α=0.05).

### 6.4.3 Fluorescencia de clorofila

La fluorescencia de la clorofila, medida a través de la eficiencia máxima del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) después de la adaptación a la oscuridad, puede ser utilizada como un indicador de estrés de las plantas (Bjorkman y Demmig, 1987). Los resultados mostraron que la fluorescencia de la clorofila de las tres colectas de *Azolla* no fue afectada ante concentraciones inferiores a 0.2 mM  $\text{Cu}^{+2}$ . Sin embargo, después de 12 h de exposición ante dosis altas de  $\text{Cu}^{+2}$  (1 y 2 mM) se induce una reducción significativa (50-65%) en la fluorescencia de clorofila en las tres colectas de *Azolla* en comparación con el testigo (Figura 6.3).



**Figura 6.3.** Respuesta del fotosistema II de tres colectas de frondas de *Azolla* expuestas a concentraciones crecientes de  $\text{Cu}^{+2}$  durante 36 h. Medias  $\pm$  error estándar. n=3.

## 6.5 DISCUSIÓN

Los resultados en la fuga de electrolitos sugieren que el  $\text{Cu}^{+2}$  induce estrés celular y daño de la membrana de frondas de *Azolla* durante las primeras horas de la exposición al metal (Figura 6.1). Es posible que en una primera etapa el  $\text{Cu}^{+2}$  se adsorba a la pared celular, ya que los polisacáridos de ésta llevan cargas negativas, las cuales atraen a los iones positivos (Sancenon, 2003); lo que induce la activación de las reacciones de defensa primaria, entre las que se encuentra la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Este término se utiliza para describir los productos de la reducción secuencial del oxígeno molecular: radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y radical hidroxilo (OH); los cuales son citotóxicos, mutagénicos y pueden modificar y dañar biomoléculas (ADN, lípidos y proteínas; Rodríguez *et al.*, 2005). En una segunda etapa, con el incremento de los iones  $\text{Cu}^{2+}$  y la producción de ROS hay una importante producción de etileno, aumenta la interacción del  $\text{Cu}^{2+}$  con el S y N de los grupos de proteínas transmembranales que provoca una alteración de los canales iónicos de la célula, lo que promueve un mayor flujo de iones, desintegración de la membrana y fuga de electrolitos (Rodríguez *et al.*, 2005; Bačkor *et al.*, 2007). Posteriormente a estos eventos se produjo la muerte celular y necrosis del tejido (Ver Capítulo VIII). Además, en respuesta a niveles tóxicos de Cu, la célula sintetiza metalotioneinas, que son proteínas con grupos tiol ricos en cisteína, que pueden quelar y acumular el Cu en la vacuola, permitiendo de esta manera desintoxicar a las células (Cobbett y Goldsbrough, 2002). Resultados similares fueron reportados por González-Mendoza *et al.* (2009) y Tamas *et al.* (2006) donde la salida de electrolitos se incrementó por la generación de ROS por exposición a Cd y Cu en *Avicennia germinans* y *Hordeum vulgare*.

En cuanto al contenido de compuestos fenólicos totales, los resultados muestran un incremento significativo en *A. filiculoides* y *A. caroliniana* expuestas a 0.02 mM en

comparación al testigo. La producción de compuestos fenólicos de ambas especies de *Azolla* en respuesta a  $\text{Cu}^{2+}$  no fue dependiente de la dosis, y no aumentó linealmente con el tiempo de exposición al metal (Figura 6.2). En este sentido, inicialmente la acumulación de iones  $\text{Cu}^{+2}$  puede estar fomentando la formación de ROS ( $\text{O}^{-2}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y OH) y posteriormente, el descenso en los compuestos fenólicos con actividad antioxidante que participan en la protección del daño celular. Además, las altas concentraciones  $\text{Cu}^{2+}$  pueden obstaculizar la activación de los mecanismos de protección de la plantas, que involucran la participación del  $\text{Cu}^{2+}$  como cofactor en la formación de la glutatión peroxidasa y de dos superóxido dismutasa (CDS1 y CDS2); CDS1 es activa en el citosol, mientras que la CDS2 es activa en el estroma del cloroplasto (Martínez-Trujillo *et al.*, 2009; Padua *et al.*, 2010). Resultados similares fueron reportados por Sivaci *et al.* (2008) para otras especies de plantas, quienes encontraron que los compuestos fenólicos de *Myophyllum* y *Potamogeton* variaron en relación a las concentraciones de Cd y la especie de planta.

Las especies de *Azolla* registraron valores máximos de eficiencia de la fluorescencia de clorofila (Fv/Fm) por encima de 0.7, en las primeras horas de exposición al  $\text{Cu}^{2+}$ , dentro de lo esperable en plantas sanas (Butler y Kitajima, 1975). Sin embargo, se registró reducción en la fluorescencia de la clorofila con el tiempo de exposición e incremento en concentración del  $\text{Cu}^{2+}$  (Figura 6.3). La disminución en la fluorescencia de clorofila es un indicador de una disminución de la eficiencia de los centros de reacción de la plastocianina, para catalizar la transferencia de los electrones entre el fotosistema II (citocromo  $b_6f$ ) y el fotosistema I, implicando un posible daño en el aparato fotosintético para utilizar toda la energía captada por los pigmentos antena (Tyystjärvi, 2008; Padua *et al.*, 2010), como se ha apuntado para otras especies vegetales (Küpper *et al.*, 2002; Letelier *et al.*, 2005, 2010). Resultados similares fueron encontrados en *Scenedesmus quadricauda*, donde el rendimiento relativo de la relación

fluorescencia de la clorofila y su dinámica (Fv/Fm) mostró una rápida inactivación del fotosistema II inducida por el  $\text{Cu}^{+2}$ , atribuido al daño en la capacidad del aparato fotosintético para el transporte eficiente de electrones y la disipación térmica del exceso de energía absorbida, la cual es mediada por el ciclo de las xantofilas (Küpper *et al.*, 2002; Letelier *et al.*, 2010).

En resumen, las reducciones en fluorescencia de la clorofila y la pérdida de electrolitos en las plantas expuestas ante bajas y altas concentraciones de  $\text{Cu}^{+2}$  indican claramente que este metal puede provocar alteraciones importantes en el aparato fotosintético del helecho *Azolla*, y por lo tanto constituyen indicadores fiables y rápidos del estado fisiológico del helecho en presencia de este metal.

## 6.6 CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que uno de los efectos negativos del cobre basado en la afectación de la fluorescencia de la clorofila y la fuga de electrolitos, está relacionado con una rápida inactivación del fotosistema II y con el daño de la permeabilidad de la membrana. Además, la fluorescencia de la clorofila y las pruebas de fuga de electrolitos pueden ser utilizadas como indicadores fisiológicos para comprender en parte, el modo principal de acción de metales pesados sobre el aparato fotosintético del helecho *Azolla*.

## CAPÍTULO VII

### ACUMULACIÓN DE COBRE Y SU IMPACTO EN LOS CONTENIDOS ELEMENTALES EN FRONDAS DE *Azolla filiculoides* Y *Azolla caroliniana*

#### RESUMEN

Este estudio comparó la capacidad de acumulación de  $\text{Cu}^{2+}$  en dos especies de *Azolla* expuestas a concentraciones crecientes (0, 0.02, 0.2, 1 y 2 mM) de  $\text{Cu}^{2+}$  en la solución nutritiva, y el impacto de la contaminación de este metal en la asimilación de Al, P, S, K, Ca, Mn, Fe y Zn en las frondas de los helechos estimado mediante fluorescencia de rayos-X por dispersión de energía. A bajas concentraciones (0.02 y 0.2 mM) *A. filiculoides* mostró mayor crecimiento (46 y 17%, respectivamente) en comparación con *A. caroliniana*. En concentraciones altas del metal (1 y 2 mM) el crecimiento de *A. filiculoides* tuvo menor inhibición (20 y 71%, respectivamente) que *A. caroliniana*. En promedio, el factor de bioacumulación (FBC) de  $\text{Cu}^{2+}$  para *A. caroliniana* fue de 87, y para *A. filiculoides* de 71. El incremento en la concentración del  $\text{Cu}^{2+}$  en la solución nutritiva resultó en la disminución del contenido de elementos en las frondas de ambos helechos. *Azolla filiculoides* tuvo mayor contenido de Al, P, Zn, Mn, Fe y Ca en comparación con *A. caroliniana*; sin embargo, *A. caroliniana* tuvo mayor contenido de S, Cl y K. Este estudio permite documentar que independientemente de las diferencias en la capacidad de bioacumulación de  $\text{Cu}^{2+}$  entre ambas especies de *Azolla*, éstas pueden tener aplicación biotecnológica en la limpieza de aguas contaminadas con Cu.

**Palabras clave:** *Azolla*, bioacumulación, fluorescencia, nutrimentos.

## CHAPTER VII

### COPPER ACCUMULATION AND ITS IMPACT ON THE ELEMENTAL CONTENT

#### IN FRONDS OF *Azolla filiculoides* AND *Azolla caroliniana*

##### ABSTRACT

This study compared the accumulation of  $\text{Cu}^{2+}$  in two species of *Azolla* grown at increased concentrations of this element (0, 0.02, 0.2, 1 and 2 mM) in nutrient solution, and its impact on the assimilation of Al, P, S, K, Ca, Mn, Fe, and Zn in the fronds of both ferns measured via the X-Ray fluorescence technique. At low concentrations (0.02 and 0.2 mM) *A. filiculoides* showed greater growth (46 and 17%, respectively) than *A. caroliniana*. In contrast, at high Cu concentrations (1 and 2 mM) the growth of *A. filiculoides* had lower inhibition (20 and 71%, respectively) than *A. caroliniana*. In average, the bioaccumulation factor of  $\text{Cu}^{2+}$  to *A. caroliniana* was 87, and to *A. filiculoides* was 71. The increased concentration of Cu in the nutrient solution resulted on decreased elemental content in the fronds of both ferns. *Azolla filiculoides* had greater content of Al, P, Zn, Mn, Fe and Ca than *A. caroliniana*; however, *A. caroliniana* had high content of S, Cl and K. This study shows that regard less of differences in  $\text{Cu}^{2+}$  bioaccumulation between the two species of *Azolla*, they could have biotechnological application in the cleanup of water contaminated with Cu

**Key words:** *Azolla*, *bioaccumulation*, *fluorescence*, *nutrients*.

## 7.1 INTRODUCCIÓN

La contaminación de los cuerpos de agua se produce comúnmente por las descargas de aguas residuales, productos químicos, sólidos suspendidos inorgánicos provenientes de la industria y los rellenos sanitarios, entre otros (Zaki y Farag, 2010). Unos de los componentes químicos potencialmente tóxicos en las descargas industriales son los metales pesados. Estos metales, en cantidades mínimas o traza, pueden ejercer efectos positivos o negativos sobre los seres vivos (Sekabira *et al.*, 2011). Algunos de ellos en determinadas concentraciones siempre menores al 0.01% de la masa total del organismo, son elementos esenciales para la vida (Vásquez *et al.*, 2003).

El ion cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) es un elemento esencial para los organismos y se encuentra en promedio 0.00007% sobre la corteza terrestre de forma natural (Kim *et al.*, 2008). No obstante, cuando se encuentra en concentraciones excesivas causa efectos tóxicos (Kirkby y Römheld, 2007). La Organización Mundial para la Salud en su guía para la calidad del agua potable, recomienda un nivel máximo de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  del ion cúprico, mientras que la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos ha establecido un valor máximo de  $1.3 \text{ mg L}^{-1}$ . Se han planteado posibles soluciones para disminuir la contaminación del agua por Cu, como la fitoextracción, que utiliza las plantas para absorber y estabilizar a este metal (Rahman y Hasegawa, 2011). Durante la fitoextracción conocida también como fitoacumulación, las plantas absorben cantidades extraordinarias de Cu y lo acumulan en tallos y hojas (López-Martínez *et al.*, 2005).

Algunas investigaciones (Sela *et al.*, 1990; Taghi *et al.*, 2005; Schor-Fumbarov *et al.*, 2005) reportan algunas especies de *Azolla* con capacidad de crecer en presencia de 1 a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  y otros metales pesados (Cd, Pb, Zn). Además, describen las áreas de acumulación de estos elementos en la pared celular y otros componentes de las frondas del helecho. La

presencia de niveles elevados de Cu activa en *Azolla* un rango amplio de respuestas celulares, incluyendo la síntesis de péptidos ricos en cisteína, denominados fitoquelatinas y metalotioneinas. Estos péptidos pueden quelar y acumular el Cu en la vacuola (Schor-Fumbarov *et al.*, 2005). No obstante, los efectos tóxicos del Cu pueden potenciarse o inhibirse dependiendo del estatus metabólico de otros elementos esenciales; de igual manera, la homeostasis de los elementos esenciales puede verse afectada positiva o negativamente por la exposición a metales (Onundi *et al.*, 2010). Sin embargo, no existe una descripción detallada sobre el impacto del Cu sobre los niveles de concentración de otros elementos que participan en actividades fisiológicas o metabólicas en las frondas del helecho *Azolla*.

## **7.2 OBJETIVO**

Comparar la capacidad de acumulación de cobre en dos especies de *Azolla*, y determinar el impacto de este metal en el contenido de otros elementos químicos esenciales en las frondas de los dos helechos.

## **7.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.3.1 Material biológico y establecimiento del experimento**

Las colectas mexicanas *Azolla filiculoides* (ENS) y *Azolla caroliniana* (XAL) se obtuvieron del *Azollatum* del Colegio de Postgraduados (Zimmerman *et al.*, 1993). Estas dos colectas fueron propagadas en solución de Yoshida (pH 5.5, Anexo I, Yoshida *et al.*, 1971), contaminada con concentraciones crecientes de CuSO<sub>4</sub> (0.0, 0.02, 0.2, 1 y 2 mM). Cada concentración tuvo tres repeticiones para cada colecta de *Azolla*. El experimento se mantuvo durante 36 h en condiciones controladas de cámara de crecimiento (26°C, fotoperiodo de 12 h, y 80% humedad relativa; Lab-Line Biotronette, Mark IV, modelo 849-6 US).

### **7.3.2 Estimulación/inhibición en crecimiento**

Después de 36 h, la biomasa del helecho se cosechó y se secó a peso constante a 70°C durante 72 h y luego se pesó para calcular la biomasa seca total. El porcentaje de estimulación o inhibición del crecimiento de *A. filiculoides* y *A. caroliniana* por la contaminación con Cu, se obtuvo de la relación del peso seco de la biomasa en cada concentración evaluada y el total de la biomasa seca del testigo considerado como el 100%.

### **7.3.3 Factor de bioacumulación y bioabsorción**

El factor de bioacumulación (FBC) de Cu por *A. filiculoides* y *A. caroliniana*, se calculó a partir de los datos de concentración del metal disuelto en la solución nutritiva y el acumulado en las frondas de *Azolla* (Iniesta y Blanco, 2005; González-Mendoza *et al.*, 2007). El factor de bioabsorción (FBA) de los elementos químicos se obtuvo del cociente de la concentración de cada elemento y la concentración del elemento en las frondas de *Azolla* del testigo.

### **7.3.4 Preparación de muestras para análisis en XRF**

Las frondas de *A. filiculoides* y *A. caroliniana* fueron procesadas para su análisis mediante XRF empleando el sistema SANDRA (Sistema de Análisis No Destructivo por Rayos-X) desarrollado en el Instituto de Física de la UNAM, México (Ruvalcaba-Sil *et al.*, 2010), siguiendo el mismo protocolo que se mencionó en el Capítulo V, sección 5.3.2.

### **7.3.5 Análisis estadístico**

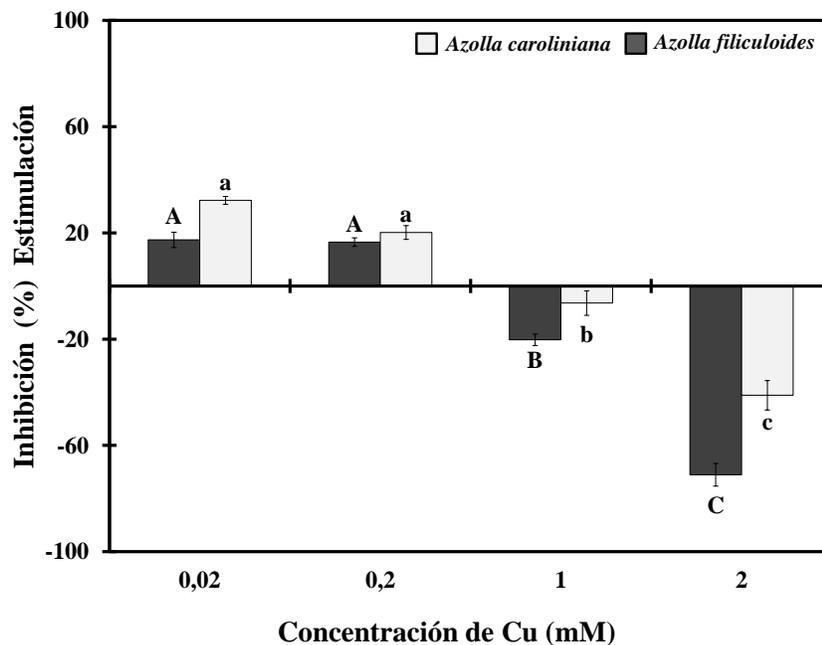
El experimento tuvo un diseño completamente al azar, con cinco tratamientos y cuatro repeticiones. El análisis del contenido elemental en cada especie de *Azolla* mediante XRF consistió en tomar cuatro lecturas en diferentes puntos de las frondas por cada concentración de Cu. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el paquete SAS (Institute Inc., 2002), y se realizó una prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ) de las variables de

crecimiento, y el contenido de elementos en cada especie de *Azolla*. Los valores se expresaran como media  $\pm$  error estándar.

## 7.4 RESULTADOS

### 7.4.1 Afectación del crecimiento

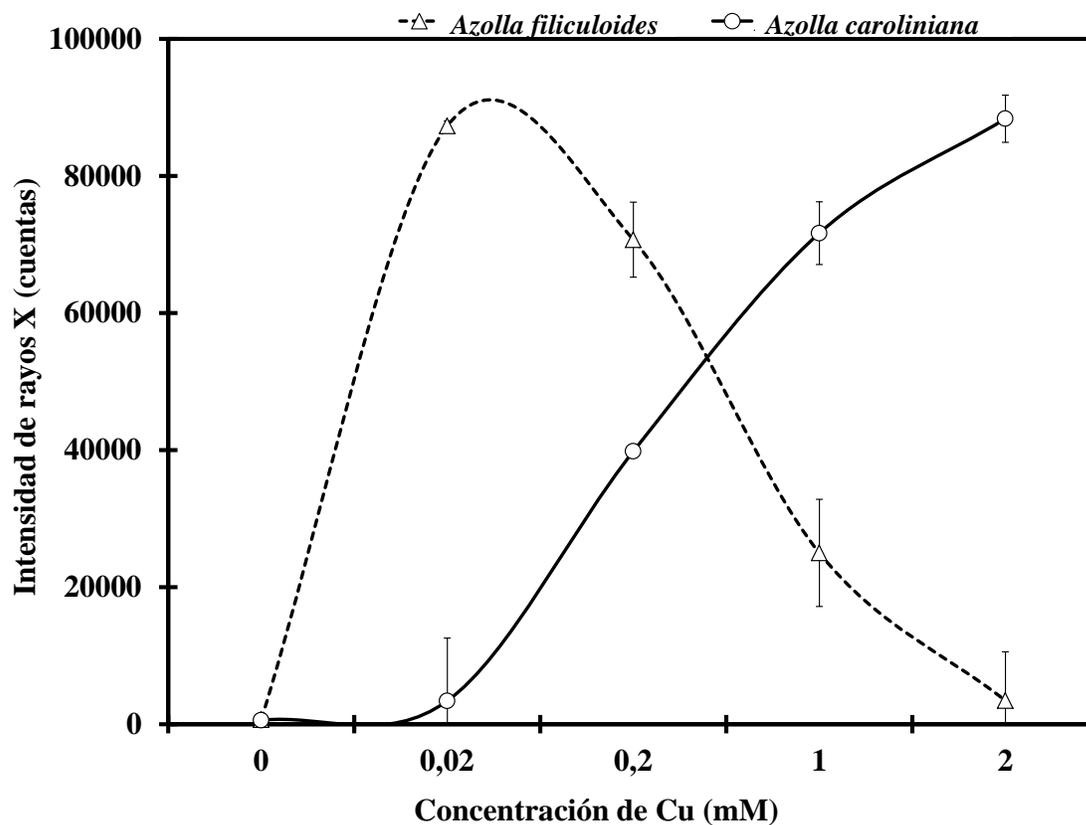
El crecimiento de ambas colectas de *Azolla* se vio afectado conforme incrementó el contenido de Cu en la solución nutritiva (Figura 7.1). En las concentraciones más bajas de Cu (0.02 y 0.2 mM), *A. caroliniana* presentó mayor crecimiento que *A. filiculoides* (46 y 17%, respectivamente); en estas concentraciones el crecimiento de *A. caroliniana* fue de 24% en promedio, y en *A. filiculoides* de 18%, en promedio (Figura 7.1). En las concentraciones más altas de Cu (1 y 2 mM), *A. filiculoides* presentó mayor inhibición del crecimiento (20 y 71%, respectivamente) que *A. caroliniana* (6 y 41%, respectivamente; Figura 7.1).



**Figura 7.1** Porcentaje de estimulación/inhibición del crecimiento de *Azolla filiculoides* y *Azolla caroliniana* después de 36 h de exposición a concentraciones crecientes de Cu en la solución nutritiva. Media  $\pm$  error estándar, n= 11. Letras diferentes sobre las barras del mismo color, y misma especie de *Azolla* indican diferencias significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

#### 7.4.2 Capacidad de bioacumulación de cobre

La capacidad de acumulación de Cu por las frondas de *Azolla* fue diferente para los dos helechos (Figura 7.2). Ante 0.02 y 0.2 mM Cu, *A. filiculoides* presentó los máximos valores de acumulación de este metal, y fueron significativamente diferentes a la acumulación de Cu obtenida en *A. caroliniana* (Figura 7.2). En contraste, en altas concentraciones de Cu (1 y 2 mM) *A. caroliniana* presentó acumulación mayor del metal que *A. filiculoides* (Figura 7.2).



**Figura 7.2** Acumulación de Cu en frondas de dos especies de *Azolla* después de 36 h de exposición a concentraciones crecientes del metal en la solución nutritiva. Medias  $\pm$  error estándar,  $n=11$ .

El FBC de Cu varió entre las especies de los helechos de *Azolla* y entre las concentraciones del metal (Cuadro 7.1). Todos los valores del FBC de Cu para ambos

helechos fueron mayores a 1, en los que *A. caroliniana* tuvo mayor FBC (87 en promedio) en comparación con *A. filiculoides* (71 en promedio). Para *A. filiculoides* el FBC disminuyó conforme la concentración de Cu incrementó en la solución (Cuadro 7.1), aunque mostró el mayor FBC ante 0.02 mM Cu y disminuyó 96% al exponerlo a 0.2 mM; en contraste, ante las más altas concentraciones de Cu (1 y 2 mM), el FBC disminuyó 71 y 18%, respectivamente, respecto a 0.02 mM Cu. En contraste, en *A. caroliniana* el FBC aumentó conforme la concentración de Cu incrementó en la solución nutritiva (Cuadro 7.1). Ante 0.02 mM de Cu, *A. caroliniana* mostró el FBC más bajo (6) y en las demás concentraciones de Cu (0.2, 1 y 2 mM) el FBC incrementó 96% en promedio, con respecto a la concentración más baja del metal (0.02 mM).

**Cuadro 7.1** Factor de bioconcentración (FBC) de Cu en dos especies de *Azolla* después de exponerlos durante 36 h a concentraciones crecientes de Cu.

Concentración Cu (mM)	FBC*	
	<i>Azolla filiculoides</i>	<i>Azolla caroliniana</i>
0.02	133	6
0.2	5	68
1	38	123
2	108	152

\*El FBC se determinó del cociente de la concentración de Cu en las frondas de *Azolla* respecto a la concentración del metal en la solución nutritiva.

#### 7.4.3 Impacto del cobre en la absorción de elementos químicos

En el Cuadro 7.2 se muestra el FBA de nueve elementos químicos por las frondas de *Azolla filiculoides*. En general, el FBA de *A. filiculoides* presentó tendencia al incremento conforme aumentó la concentración de Cu. El FBA de P incrementó 38% en promedio, ante 0.2, 1 y 2 mM de Cu con respecto a su valor obtenido con 0.02 mM. El FBA de Al incrementó

64% ante 0.2 mM de Cu, y en la concentración más alta (2mM) incrementó su valor en 86%, con respecto a la concentración más baja (0.02 mM; Cuadro 7.2). Para el Zn, el FBA varió hasta 3% en las diferentes concentraciones de Cu evaluadas (Cuadro 7.2). Para 0.2 mM de Cu el FBA de Mn, Cl, y S incrementó 150%, 229% y 26%, respectivamente en relación al valor calculado ante 0.02 mM de Cu; y ante la concentración de Cu más alta (2 mM) el FBA de estos elementos incremento 113%, 171% y 35%, respectivamente. El FBA del Fe varió desde 3% hasta 53% en las diferentes concentraciones de Cu evaluadas (Cuadro 7.2). Ante las concentraciones de 0.2, 1 y 2 mM Cu, el FBA de Ca incrementó 49%, 14% y 71%, respectivamente con respecto a la concentración del metal más baja (0.02 mM Cu). Para el K, el FBA incrementó 157%, 80% y 131% ante las concentraciones de 0.2, 1 y 2 mM Cu, respectivamente (Cuadro 7.2).

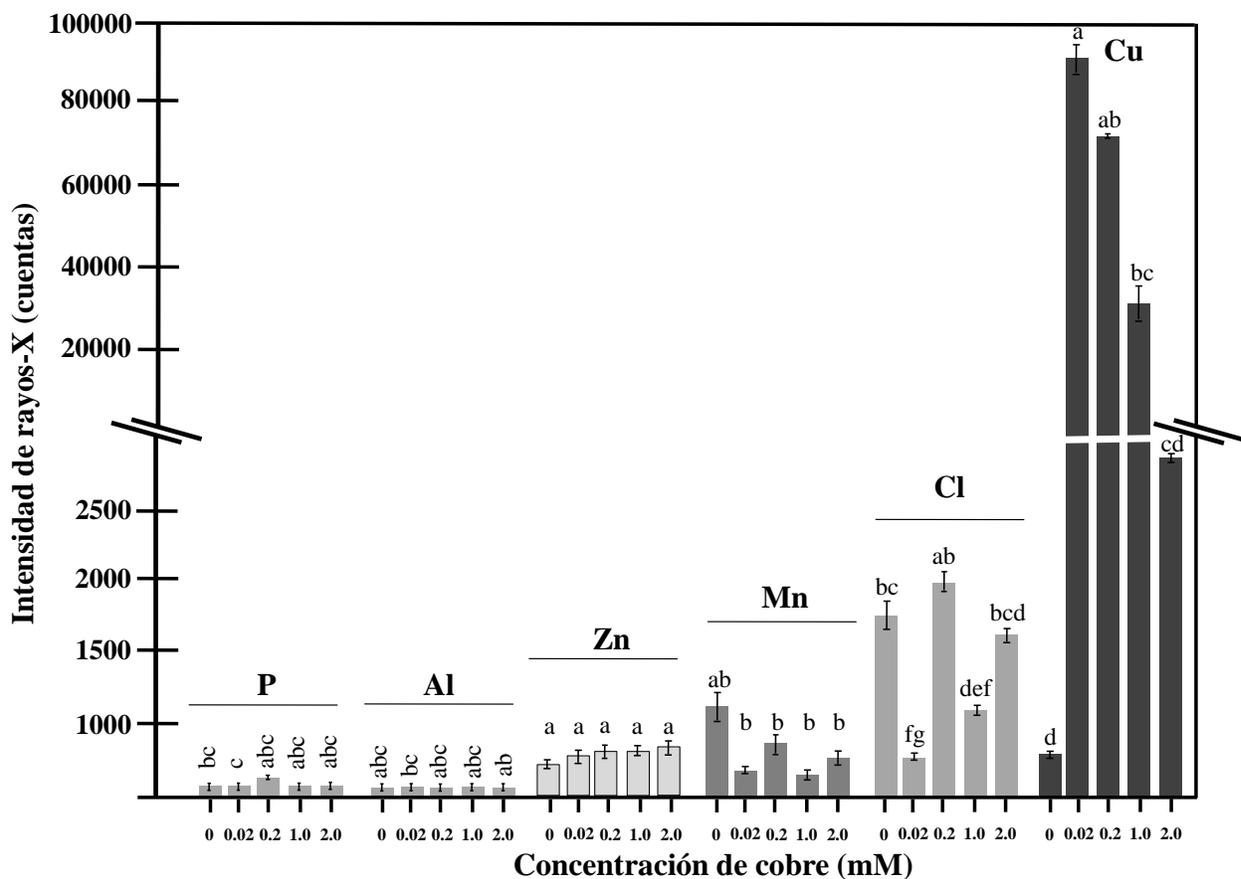
**Cuadro 7.2** Factor de bioabsorción (FBA) de elementos químicos en frondas de *Azolla filiculoides* expuesta 36 h a concentraciones crecientes de Cu en la solución nutritiva.

Concentración Cu (mM)	Factor de Bioabsorción*								
	P	Al	Zn	Mn	Cl	S	Fe	Ca	K
0.02	0.90	0.62	1.26	0.25	0.34	0.70	0.75	0.65	0.37
0.2	1.34	1.03	1.29	0.61	1.10	0.88	1.17	0.97	0.94
1	1.18	0.93	1.28	0.24	0.65	0.82	0.73	0.74	0.66
2	1.18	1.16	1.30	0.52	0.91	0.95	1.13	1.11	0.85

\*El FBA se determinó del cociente de la concentración del elemento en las frondas del helecho de cada concentración expuesta a Cu y la concentración del elemento en el testigo.

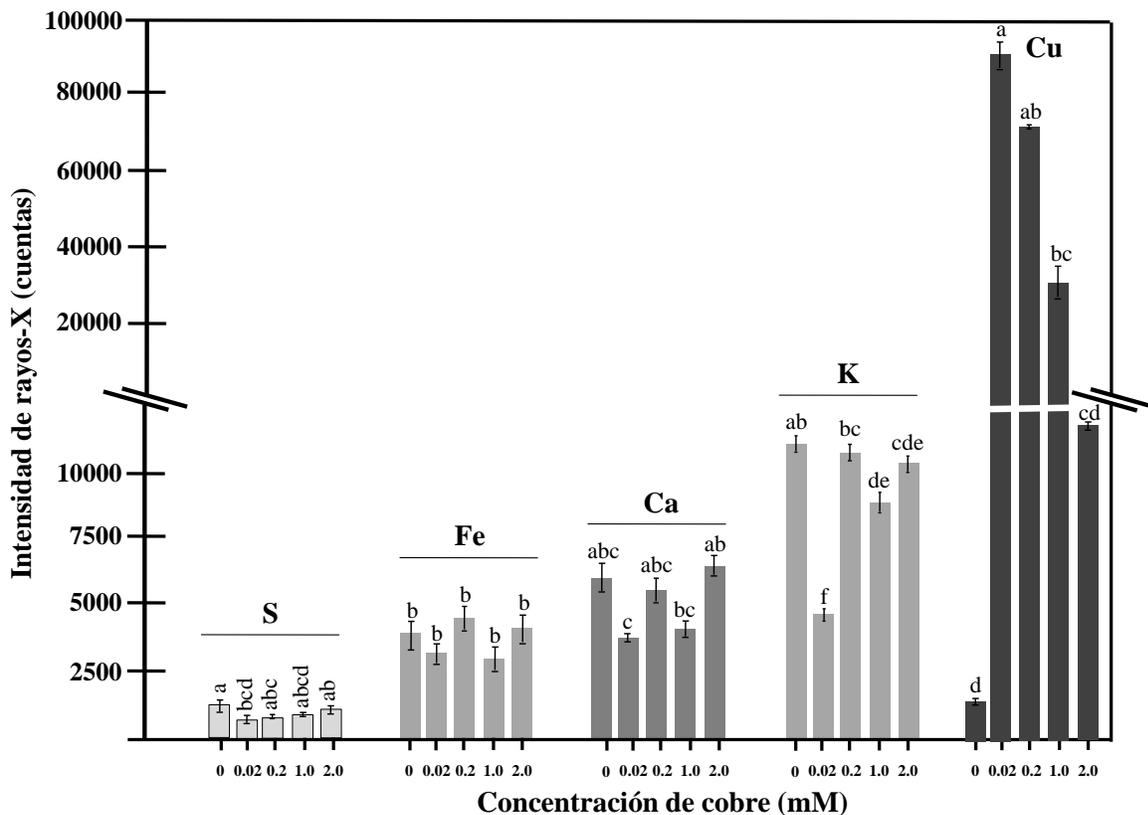
La concentración de Cu en las frondas de *Azolla filiculoides* presentó diferencias significativas, por efecto de la concentración de Cu en la solución nutritiva. El tratamiento que mostró el contenido mayor de Cu se obtuvo al exponer al helecho a 0.02 mM; mientras que el

menor contenido del metal se observó ante 2.0 mM (Figura 7.3). El incremento en la concentración de Cu en la solución nutritiva tuvo un efecto negativo en el contenido elemental en las frondas de *Azolla filiculoides* (Figura 7.3). El contenido de P, Al y Zn incrementó ligeramente en las frondas del helecho conforme aumentó la concentración de Cu (Figura 7.3). El contenido de Mn disminuyó con el incremento de la concentración de Cu en la solución nutritiva (Figura 7.3). Mientras que, el contenido de Cl presentó diferencias significativas en las diferentes concentraciones de Cu evaluadas (Figura 7.3); éste elemento presentó la concentración más bajas ante 0.02 mM de Cu; mientras que la mayor concentración ocurrió ante 0.2 y 2 mM.



**Figura 7.3.** Contenido de P, Al, Zn, Mn, Cl y Cu en frondas de *Azolla filiculoides* después de 36 h de exposición a concentraciones crecientes de Cu. Medias  $\pm$  error estándar, n=11. Letras diferentes sobre las barras del mismo elemento indican diferencias significativas.

El contenido de Fe en las frondas de *Azolla filiculoides* no presentó diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de Cu utilizadas en esta investigación (Figura 7.4). Sin embargo, el S, K y Ca mostraron diferencias significativas al incrementar la concentración de Cu en la solución nutritiva (Figura 7.4). La concentración más baja de S, Ca, Fe y K ocurrió ante 0.02 mM Cu; mientras que la mayor concentración se estimó ante 0.2 y 2 mM Cu.



**Figura 7.4** Contenido de S, Fe, Ca, K y Cu en *Azolla filiculoides* después de 36 h de exposición a concentraciones crecientes de Cu. Medias  $\pm$  error estándar, n=11. Letras diferentes sobre las barras del mismo elemento indican diferencias significativas.

En general, el FBA de los nueve elementos químicos por las frondas de *A. caroliniana* presentó tendencia al descenso al aumentar la concentración de Cu (Cuadro 7.3). El FBA de P disminuyó 19%, 14% y 39% ante las concentraciones 0.2, 1 y 2 mM Cu respectivamente, con

respecto a su valor en la concentración 0.02 mM Cu (Cuadro 7.3). Para el Al, el FBA disminuyó su valor 18% y 57% ante las concentraciones más altas de Cu (1 y 2 mM Cu), con respecto a la concentración más baja del metal (0.02 mM Cu; Cuadro 7.3). Para el Zn, el FBA disminuyó 26%, 7% y 29% al incrementar la concentración del Cu (0.2, 1 y 2 mM, respectivamente; Cuadro 7.3), con respecto a la concentración de 0.02 mM Cu (Cuadro 7.2). Ante 0.2, 1 y 2 mM Cu el FBA de Mn disminuyó 41%, 66% y 75% respectivamente, en relación a la concentración 0.02 mM Cu. Para el S, el FBA disminuyó desde 3% ante 0.2 mM mL<sup>-1</sup>, hasta 11% y 16% en las concentraciones más altas de Cu (1 y 2 mM mL<sup>-1</sup>). El FBA del Cl disminuyó 21%, 49% y 68% conforme incrementó el Cu en la solución nutritiva (0.2, 1 y 2 mM). De forma similar, el FBA de Fe (40% en promedio) y Ca (32%, en promedio) disminuyó en las concentraciones de 0.2, 1 y 2 mM con respecto al obtenido en 0.02 mM (Cuadro 7.3).

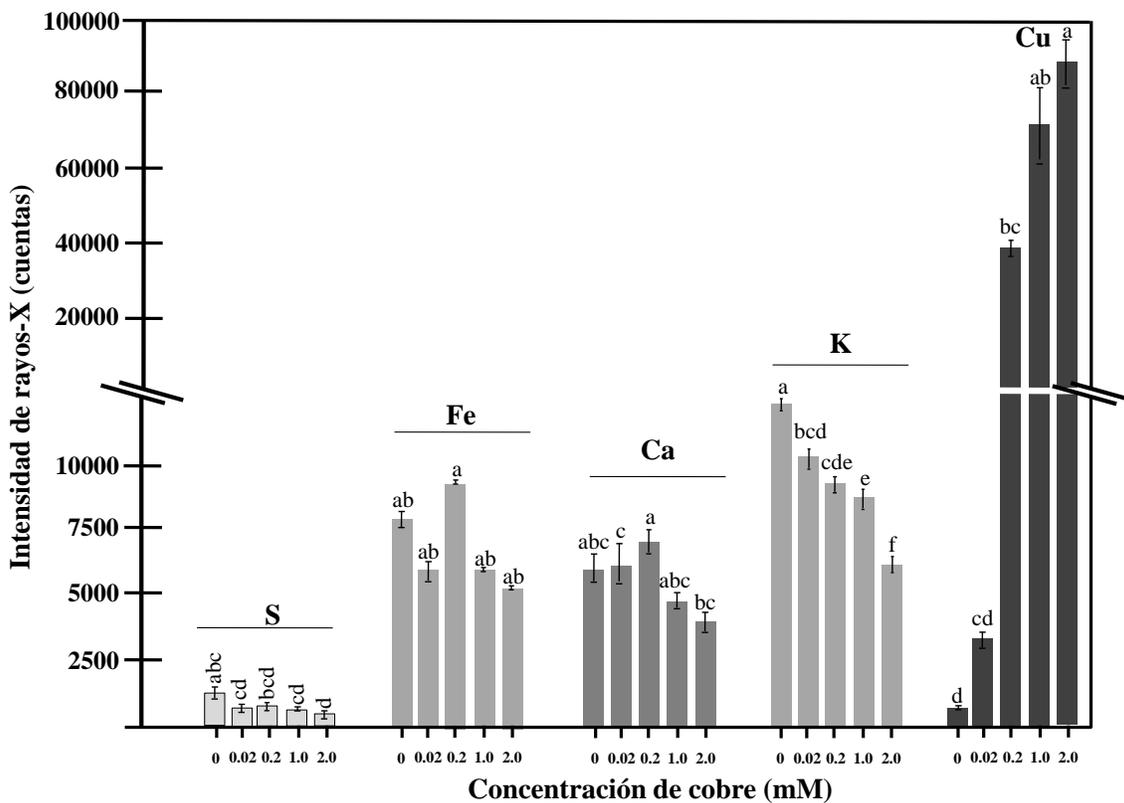
**Cuadro 7.3** Factor de bioabsorción (FBA) de nueve elementos químicos en frondas de *Azolla caroliniana* expuesta a concentraciones crecientes de Cu en la solución nutritiva, durante 36 h.

Concentración Cu (mM)	Factor de Bioabsorción*								
	P	Al	Zn	Mn	Cl	S	Fe	Ca	K
0.02	1.27	0.77	0.99	0.50	0.71	0.78	1.24	1.25	0.75
0.2	1.07	0.72	0.73	0.29	0.56	0.76	0.77	1.01	0.61
1	1.10	0.59	0.91	0.17	0.36	0.68	0.77	0.83	0.54
2	0.78	0.31	0.70	0.13	0.23	0.63	0.68	0.71	0.24

\*El FBA se determinó del cociente de la concentración del elemento en las frondas del helecho de cada concentración expuesta a Cu y la concentración del elemento en el testigo.

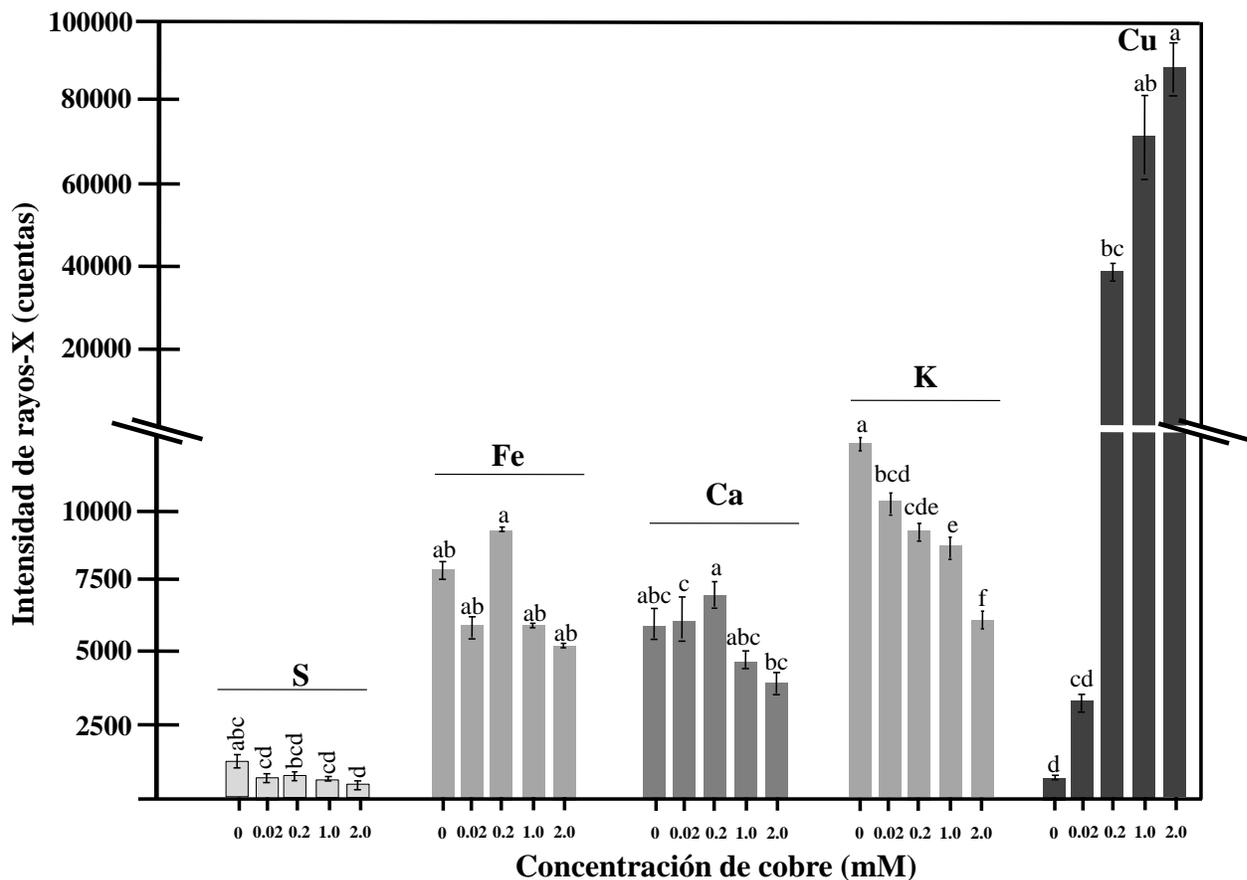
La concentración de Cu en las frondas de *Azolla caroliniana* presentó diferencias significativas, por efecto de la concentración de Cu en la solución nutritiva. El helecho

presentó el contenido mayor de Cu ante 2 mM Cu; mientras que el menor contenido del metal se obtuvo ante 0.02 mM Cu y el testigo (Figura 7.5). El incremento en la concentración de Cu en la solución nutritiva tuvo un efecto negativo en el contenido elemental en las frondas de *Azolla caroliniana* (Figura 7.5). El contenido de P, Al, Mn y Cl disminuyó significativamente en las frondas del helecho conforme aumentó la concentración de Cu; mientras que en el contenido de Zn no presentó diferencias significativas (Figura 7.3). El contenido de Mn en las frondas del helecho disminuyó significativamente, con respecto a su contenido en el testigo, pero sin presentar diferencias significativas en las diferentes concentraciones de Cu evaluadas. El contenido de Cl presentó diferencias significativas en todas las concentraciones de Cu (Figura 7.5).



**Figura 7.5** Contenido de fósforo, aluminio, zinc, manganeso, cloro y cobre en frondas de *Azolla caroliniana* después de 36 h de exposición a concentraciones crecientes de Cu. Medias  $\pm$  error estándar, n=11. Letras diferentes sobre las barras del mismo elemento indican diferencias significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

La concentración elemental en las frondas de *Azolla caroliniana* mostró una tendencia a disminuir conforme incrementó la concentración de Cu; principalmente en las concentraciones del metal más altas (1 y 2 mM; Figura 7.6). La concentración de S y K disminuyó significativamente con el incremento de Cu en la solución nutritiva (Figura 7.6). La concentración de Fe y Ca tuvo un comportamiento similar en las diferentes concentraciones de Cu (Figura 7.6), excepto ante 0.02 mM Cu donde el Fe disminuyó con respecto al testigo. La concentración más alta de Fe y Ca se observó ante 0.2 mM Cu, y la concentración más baja de ambos elementos fue en las concentraciones más altas del metal (1 y 2 mM Cu; Figura 7.6).



**Figura 7.6** Contenido de S, Fe, Ca, K y Cu en frondas de *Azolla caroliniana* después de 36 h de exposición a concentraciones crecientes de Cu. Medias  $\pm$  error estándar, n=11. Letras diferentes sobre las barras del mismo elemento indican diferencias significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

## 7.5 DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este trabajo muestran que el Cu afectó el crecimiento de *Azolla filiculoides* y *Azolla caroliniana* (Figura 7.1). Ante las concentraciones bajas de Cu (0.02 y 0.2 mM) hubo estimulación del crecimiento en ambas especies de *Azolla filiculoides*. Es posible que esta respuesta de los helechos se relacione con el contenido de compuestos fenólicos (Ver Capítulo VI), lo que permitió tolerar las condiciones de estrés por Cu y mantener activo el mecanismo encargado de la regulación del crecimiento (Ortíz-Castro *et al.*, 2007). Los resultados muestran que el crecimiento de *Azolla filiculoides* y *Azolla caroliniana* fue estimulado por la presencia de Cu hasta un 24%, lo que permite reforzar el planteamiento de que este elemento es un factor de crecimiento.

El crecimiento de ambas especies de *Azolla* se inhibió al aumentar la concentración de Cu (1 y 2 mM; Figura 7.1). Este comportamiento puede ser atribuido al efecto nocivo del Cu en la producción de plastocianina y de clorofila, posiblemente por el daño ocasionado a las membranas de los tilacoides (Salt *et al.*, 1995; Byung-Eun *et al.*, 2008). La reducción del transporte fotosintético de electrones, como consecuencia de menores contenidos de plastocianina, una proteína que contiene Cu, provoca la disminución de la tasa de fijación de CO<sub>2</sub>, de modo que el contenido de almidón y de carbohidratos solubles también se reduce. Este es el principal factor que provoca disminución o inhibición del crecimiento. Además, cuando se presenta toxicidad por Cu, la actividad de los sistemas enzimáticos sufre un desequilibrio de forma irreversible (Merchant, 2007). Esta respuesta de inhibición del crecimiento de *Azolla* y otras especies vegetales por la presencia de Cu ha sido reportada previamente. Mordechai *et al.* (1989) reportaron inhibición del crecimiento (22%) de *Azolla filiculoides* ante 0.9 mM CuSO<sub>4</sub>. Más aún, Martínez-Trujillo *et al.* (2009) reportaron que *Arabidopsis thaliana* L. inhibió el crecimiento (45%) por exposición a 0.045 mM Cu.

La exposición a concentraciones crecientes de Cu permitió determinar el FBC de este metal en ambos helechos de *Azolla* (Cuadro 7.1). Todos los valores del FBC de Cu para ambos helechos fueron muy altos; en el caso de *A. Caroliniana* el valor del FBC fue 87 en promedio, mientras que para *Azolla filiculoides* fue 71 en promedio. Zayed *et al.* (1998) clasificaron la capacidad de bioacumulación de metales en las plantas con base al valor del FBC en: <1 exclutoras, >1 acumuladoras de metal y  $\geq 1000$  hiperacumuladoras de metal. En este contexto, los resultados obtenidos en esta investigación muestran que ambos helechos de *Azolla* se comportan como acumuladores de Cu, con potencial alto de uso exitoso como biotecnología de limpieza de aguas contaminadas con Cu, ya que de acuerdo con McGrath y Zhao (2003) para lograr una fitoextracción de metales exitosa es necesario alcanzar valores de bioconcentración mayor a 20, lo que permite reducir a la mitad la concentración del metal disuelto, en tiempos cortos. Zhao *et al.* (2002) reportan que la capacidad de acumulación de metales se debe a la presencia de ciertas macromoléculas identificadas como metalotioneinas y otras proteínas de bajo peso molecular.

Bajo las condiciones experimentales de este trabajo, *A. filiculoides* llegó en las primeras 12 h a la capacidad máxima de acumulación de Cu en comparación con *A. caroliniana*, esto puede ser debido a los diferencias morfo-estructurales y bioquímicas entre ambas especies de helechos. Al respecto, *A. caroliniana* se distingue por presentar el patrón de ramificación descrito como pseudodicotómico, y el número reducido de tricomas formado por escasas células presentes en la parte dorsal de la fronda (Van-Hove, 2004). Mientras que, *A. filiculoides* presenta ramificación del tipo simpódico (dicasio, la ramificación se dispone en distintas direcciones del espacio), con dos capas de células grandes en la parte dorsal de la fronda, y la disposición y número abundante de los tricomas en las frondas le permite tener mayor área de contacto con la superficie del agua, el esporofito es recubierto por una pared

celular gruesa y tiene alto contenido de C-glucosil-flavonoides (Teixeira *et al.*, 2000). Estas características de *A. filiculoides* pudieron haber facilitado que el proceso de acumulación de Cu ocurriera rápidamente. En una primera etapa, el Cu se adsorbió a los polisacáridos de la pared celular (Sancenon, 2003). Esta etapa transcurrió en muy poco tiempo y fue similar tanto en la pared celular como en todas las células de las frondas. En una segunda etapa los iones Cu pasaron a través de la membrana celular mediante transportadores específicos que se expresa principalmente en la raíz (Sancenon *et al.*, 2003; Öpik y Rolfe, 2005; Shen-Gen *et al.*, 2005). Lo anterior podría explicar porque *A. filiculoides* a bajas concentraciones de Cu (0.02 mM) llegó a su capacidad máxima de acumulación. En el caso de *A. caroliniana* aun cuando su crecimiento se inhibió ante 1 mM, el helecho continuó acumulando Cu ante 2 mM, sin llegar a su capacidad de acumulación máxima (Figura 7.2). Lo anterior pudo ser debido a que muchas de las células de las frondas sufrieron lisis por exposición al metal (Ver Capítulo VIII), lo que provocó modificaciones en la permeabilidad de la membrana celular, y el Cu formó ligandos con las células muertas. Se ha determinado que los principales ligandos de Cu son grupos funcionales como aminas, alcoholes, fosfatos e hidroxilos presentes en la mezcla de complejos de glucosamina, proteínas y ácido urónico que forman parte de la composición de la pared celular (Teixeira *et al.*, 2001).

Las plantas absorben diversos elementos, algunos de ellos se requieren para el metabolismo, crecimiento y desarrollo, pero los problemas se originan cuando las células son confrontadas con un exceso de estos iones (Scheckhuber *et al.*, 2009). Ante el incremento en la concentración de Cu en ambas especies de *Azolla* la capacidad de absorción de otros elementos fue diferente entre sí (Cuadro 7.2 y 7.3). Lo anterior concuerda con lo mencionado por Zhao *et al.* (2002) en el sentido de que la capacidad para absorber y acumular algunos elementos difiere en una misma especie vegetal e, incluso entre las variedades aún bajo

condiciones de toxicidad por metales. Esta diferencia en la capacidad de absorción de otros elementos en ambos helechos de *Azolla* puede estar más relacionada a las características físicas, químicas y competencia de cada ion libre que a la concentración del Cu (Sunda y Lewis, 1978; Chojnacka, 2005).

Un factor que pudo haber influido en las diferencias observadas en la absorción de elementos por ambas especies de *Azolla* (Figuras 7.3 a 7.6), se relaciona con la capacidad de respuesta ante las condiciones de incremento de Cu. En este sentido, Zimmerman *et al.* (1989) reportaron que *Azolla filiculoides* tienen mayor capacidad de respuesta inmediata e incrementar el contenido de enzimas antioxidantes en comparación con *Azolla caroliniana* por exposición a condiciones de estrés abiótico (temperatura, luz). Por su parte, Yuh-Shan (2003) evaluó la capacidad de absorción y acumulación de Cu en tres especies de helechos arborescentes, y encontró que los helechos remueven en promedio 11.7 mg Cu g<sup>-1</sup>, dependiendo de la especie, de la temperatura y de la concentración de este metal. Este investigador atribuye las diferencias en la capacidad de absorción de los elementos a la concentración de lignina y celulosa, ya que estos polímeros tienen la capacidad de adsorber los elementos mediante grupos funcionales polares (alcoholes, aldehídos, cetonas y otros componentes de la pared). Además, concluye que la capacidad de sorción de cationes metálicos esta mediado por las características ácidas y polares de la pared celular de los helechos.

Otro factor que pudo haber influido en la asimilación de elementos en ambas especies de *Azolla* fue la modificación del pH de la solución nutritiva, lo que afectó la disponibilidad de los elementos en solución. *Azolla caroliniana* mostró la tendencia a disminuir el pH de 6.2 hasta 4.6. Se sabe que el Cu es bastante soluble en pH a valores menores a 4, incluso en presencia de otros elementos, por otro lado, el ion Cu empieza a precipitar como hidróxido en

pH alrededor de 6. En contraste, bajo las condiciones evaluadas en esta investigación, *Azolla filiculoides* ante concentraciones bajas de Cu incrementó el pH de 6.6 a 8.1; mientras que ante concentraciones altas de Cu, el pH disminuyó hasta pH 4.6. El cambio de pH pudo haber modificado el proceso fisiológico de absorción de Cu y otros elementos esenciales por parte de los helechos. El pH es modificado por la liberación de ácidos orgánicos por los helechos, que influyen en la relación de absorción de elementos negativamente cargados (aniones) y los cargados positivamente (cationes). En general, un exceso en la absorción de cationes sobre aniones, provoca un descenso del pH, mientras que un exceso en la absorción de aniones sobre cationes produce un incremento del pH (Stepniewska *et al.*, 2005).

Aun cuando ambos helechos de *Azolla* ante 1 mM de Cu inhibieron su crecimiento, éstos continuaron biosorbiendo elementos en su biomasa ante las concentraciones más altas de Cu (Figuras 7.3 a 7.6). Este continuo de sorción e intercambio de iones metales pesados por la biomasa inactiva (muerta) de *Azolla* involucra la activación de agentes oxidantes en la pared celular que realizan la sorción o intercambio de iones metálicos (Taghi *et al.*, 2005; Khosravi *et al.*, 2005). El proceso de biosorción en la biomasa inactiva se puede llevar a cabo por la presencia de polisacáridos, como la pectina y la celulosa. Ambos polisacáridos están formados por fragmentos de ácido poligalacturónico y son constituyentes de la pared celular. Estos polisacáridos en su estructura contienen grupos oxidrilo, carboxilo, metoxilo que forman complejos con los iones (Kamnev *et al.*, 1998; Synytsya *et al.*, 2003; Taghi *et al.*, 2005). Sin embargo, se requieren estudios adicionales sobre los procesos de sorción y desorción en *Azolla* para asegurar lo anterior.

## 7.6 CONCLUSIONES

Ambas especies de *Azolla* tienen la capacidad de bioacumular Cu en sus frondas. La capacidad de acumulación máxima de Cu en *Azolla filiculoides* se observó ante 0.2 mM; mientras que *Azolla caroliniana* continuo acumulando el metal en la concentración más alta de Cu (2 mM).

El efecto tóxico del Cu para ambas especies de *Azolla* se manifestó con la inhibición del crecimiento (1 mM); sin embargo, cuando altas concentraciones de Cu (2 mM) prevalecen en la solución nutritiva, *Azolla caroliniana* presentó mayores posibilidades de crecer y sobrevivir en comparación con *Azolla filiculoides*.

La capacidad de acumulación de cobre en las frondas de *Azolla filiculoides* modifica significativamente el balance homeostático de concentración de P, Al, Mn, Cl, S, Ca y K; mientras que en *Azolla caroliniana* en P, Al, Cl, S, Ca y K.

## CAPÍTULO VIII

### MODIFICACIÓN MORFO-ESTRUCTURAL DEL SIMBIOSISTEMA *Azolla-Anabaena azollae* POR EXPOSICIÓN A ARSÉNICO Y COBRE

#### RESUMEN

Este trabajo determinó las modificaciones morfo-estructurales de dos especies de *Azolla* por efecto de exposición ante arsénico ( $\text{As}^{5+}$ ) y cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ). *Azolla filiculoides* se expuso a concentraciones crecientes de As (0, 5, 10, 20 y 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) durante 96 h. Para el caso del cobre, los helechos *Azolla filiculoides* y *Azolla caroliniana*, se expusieron durante 36 h a concentraciones crecientes de  $\text{Cu}^{2+}$  (0, 0.02, 0.2, 1 y 2 mM). Las muestras de frondas basales se procesaron para su análisis mediante microscopía de luz. Los resultados mostraron que el incremento en la concentración de  $\text{As}^{5+}$  ( $> 20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) o de  $\text{Cu}^{2+}$  ( $>1 \text{ mM}$ ) produjo cambios morfo-estructurales en las frondas de las especies de *Azolla*. Estos cambios estuvieron principalmente asociados en la disminución del número de plastidios (60 a 80%), desorganización celular, atrofia parda y necrosada, lisis de células epidérmicas y deshidratación de los primordios foliares de las frondas. El  $\text{As}^{5+}$  ( $> 60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y el  $\text{Cu}^{2+}$  ( $> 1 \text{ mM}$ ) tuvieron un efecto negativo sobre la cianobacteria *Anabaena azollae* al mostrar cadenas de células más cortas y heterocistos separados. Esta investigación aporta evidencias sobre las modificaciones morfo-estructurales que sufre el simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae* en condiciones de contaminación con  $\text{As}^{5+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$ . Como conclusión, el simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae* podría ser utilizado como bioindicador de contaminación de cuerpos de agua por estos dos contaminantes inorgánicos.

**Palabras clave:** Helecho, cianobacteria, morfo-estructura, metal pesado, metaloide.

## CHAPTER VIII

### MORPHO-STRUCTURAL MODIFICATIONS IN THE *Azolla-Anabaena azollae* SYMBIOSYSTEM DUE TO ARSENIC AND COPPER EXPOSURE

#### ABSTRACT

This work determined the morpho-structural modifications in two species of *Azolla* exposed to arsenic ( $\text{As}^{5+}$ ) and copper ( $\text{Cu}^{2+}$ ). *Azolla filiculoides* was exposed to increased concentrations of As (0, 5, 10, 20 and 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) for 96 h. For copper, the ferns *A. filiculoides* and *A. caroliniana* were exposed to increased concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  (0, 0.02, 0.2, 1 and 2 mM) for 36 h. The basal fronds were processed to their analysis under light microscope. Results showed that the increase of the As ( $> 20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) or  $\text{Cu}^{2+}$  ( $>1 \text{ mM}$ ) concentrations exerted morpho-structural changes in fronds of the *Azolla* species. These changes were mainly associated with diminished number of plastids (60 a 80%), cellular disorganization, brown and necrotic atrophy, epidermal cell lysis, and dehydration of the leaf primordial of the fronds. The  $\text{As}^{+5}$  ( $> 60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and the  $\text{Cu}^{2+}$  ( $> 1 \text{ mM}$ ) had a negative effects on the cyanobacterium *Anabaena azollae* which showed shorter cell chains and detached heterocysts. This research provides scientific evidence about the morpho-structural modifications that occur in the *Azolla-Anabaena azollae* symbiosystem under  $\text{As}^{5+}$  or  $\text{Cu}^{2+}$  contamination. As conclusion, this symbiosystem may be utilized as a bioindicator in water bodies contaminated by these two inorganic pollutants.

**Key words:** *Fern, cyanobacteria, morpho-structure, heavy metal, metalloid.*

## 8.1 INTRODUCCIÓN

En los ecosistemas acuáticos, la mayor fuente de contaminación la constituyen los metales pesados y metaloides, que pueden provenir de la aplicación sucesiva y masiva de los plaguicidas, el aprovechamiento de aguas residuales y los residuos urbanos e industriales (Ghosh y Singh, 2005; Padmavathiamma y Li, 2007). El exceso de iones metálicos o metaloides solubles puede desencadenar en las plantas una serie de alteraciones bioquímicas y estructurales. Los iones presentan un patrón de distribución irregular dentro de los diferentes tejidos, y pueden provocar diferentes efectos tóxicos y diferentes tipos de daño estructural dentro de estos tejidos (Bondana *et al.*, 2004). Muchas especies vegetales son tolerantes a la toxicidad de los metales o metaloides, ya que utilizan estrategias de absorción, transferencia y acumulación de estos iones en la parte aérea (Ma *et al.*, 2001; Tu y Ma, 2002).

Existen alrededor de 400 taxas identificadas como plantas acumuladoras de Cd, Pb, Cu, Zn y As (Brooks, 1998; Ma *et al.*, 2001; Tu y Ma, 2002), y estas especies han atraído el interés por su capacidad potencial para extraer metales o metaloides de los cuerpos de agua, y están siendo objeto de investigación para fines de fitorremediación. El simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae* es un helecho acuático pequeño, ampliamente distribuido, especialmente en ambientes tropicales (Adams *et al.*, 2006), que tiene la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico (Carrapico, 2001). Este simbiosistema consiste en un esporofito corto y ramificado con raíces cortas, que flota en el agua por la disposición de las frondas. Cada fronda consiste de un lóbulo ventral aclorofílico y un lóbulo dorsal clorofílico (Carrapico, 2000; 2006). En el lóbulo dorsal se forma una cavidad donde habita la cianobacteria *Anabaena azollae*; y se utiliza como indicador de contaminación orgánica (Forni *et al.*, 2001, 2002). Sin embargo, no se tienen reportes que detallen los cambios morfo-estructurales de *Azolla* por

exposición a metaloides o metales pesados, más aún sobre los efectos tóxicos de estos elementos tóxicos en el cianobionte *Anabaena azollae*.

## 8.2 OBJETIVO

Evaluar las modificaciones morfo-estructurales del simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae* por exposición a arsénico y cobre.

## 8.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.3.1 Material biológico

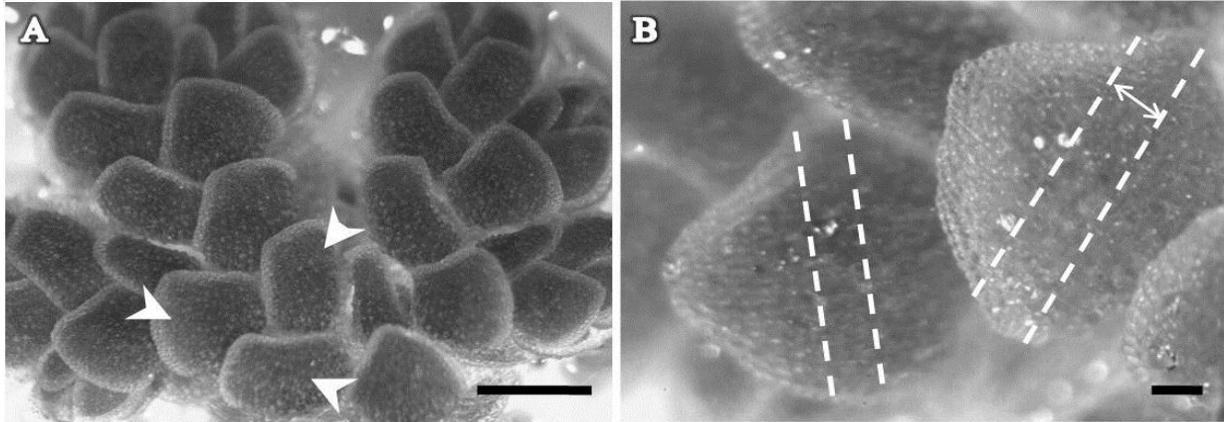
Se establecieron dos experimentos con dos especies de *Azolla*. En un primer experimento, se utilizó la colecta de *Azolla filiculoides* (ENS, 1 g de peso fresco). El helecho se colocó en recipientes de plástico con solución de Yoshida (pH 5.5, Anexo I; Yoshida *et al.*, 1971), contaminada con concentraciones crecientes de As (0, 5, 10, 20 y 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). El tiempo de exposición al metaloide fueron 96 h.

En un segundo experimento, se utilizó 1 g de peso fresco de las colectas *Azolla caroliniana* (CEG) y *Azolla filiculoides* (ENS). Ambos helechos fueron expuestos a solución de Yoshida (pH 5.5, Anexo I; Yoshida *et al.*, 1971), contaminada con concentraciones crecientes de Cu (0, 0.02, 0.2, 1 y 2 mM). El tiempo de exposición al metal fue de 36 h. Ambos experimentos se mantuvieron en condiciones controladas de cámara de crecimiento (26°C, 12 h fotoperiodo, luz 280  $\mu\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ , y 80% HR; Lab-Line Biotronette).

### 8.3.2 Análisis de la morfo-estructura de *Azolla*

Los fragmentos (1 mm) transversales de *Azolla* obtenidos de la base de la fronda; (Figuras 8.1 A y B) de cada especie del helecho que estaban expuestas a As y Cu, se fijaron en una solución de 2.5% de glutaraldehído en amortiguador de fosfato Sorensen 0.1 M (16.73 g

de  $K_2HPO_4$ , 0.523 g de  $KHPO_4$  en 1 L agua destilada), pH 7.2. Al material una vez fijado se aplicó vacío durante 2 h, para eliminar el aire y favorecer la penetración del fijador.



**Figura 8.1** Frondas de *Azolla*. A) frondas basales seleccionadas (flechas) para la obtención de cortes (Barra=5 mm) y; B) área de corte en fronda basal (Barra=0.5 mm).

Los tejidos se lavaron dos veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, por dos horas en cada lavado, y con agua desionizada por 30 min. Posteriormente, se postfijaron en tetraóxido de osmio ( $OsO_4$ ) por 2 h. Los tejidos se deshidrataron en una serie gradual de etanol (30%, 50%, 70%, 90% y dos cambios en 100%), considerando 20 min en cada cambio de etanol. La inclusión se realizó en una serie gradual de resina LR-Write/Etanol 1:1 (v/v; London Resin Company, Ltd., Reading, England); 10%, 30%, 50%, 70%, 90% y dos cambios en 100%, con un tiempo de 20 min para cada cambio. Los fragmentos de tejido se incluyeron y polimerizaron en cápsulas de gelatina a 60 °C. Una vez polimerizados los bloques de resina con las frondas de *Azolla* se hicieron cortes de 1  $\mu m$  de grosor con cuchillas de vidrio con la ayuda de un ultramicrotomo (Reichert, Leica microsystems Inc., Chicago, IL). Finalmente, los tejidos se tiñeron con azul de metileno 1% (Azul de metileno 1% + Azur 1%). La detección de los cambios morfo-estructurales por efecto del As y Cu sobre los dos simbiosistemas *Azolla-Anabaena azollae* fueron observados en un microscopio óptico (Axoscop PLUS 2, Zeiss,

Alemania) y fotografiadas con una cámara Axios CAM, del laboratorio de anatomía e histoquímica vegetal del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

### **8.3.3 Análisis del efecto del arsénico sobre la cianobacteria *Anabaena azollae***

Los efectos tóxicos del As sobre la cianobacteria *Anabaena azollae* fueron observados con ayuda de un microscopio de luz. Después de 96 h de exposición a As de *Azolla filiculoides* se hicieron observaciones microscópicas. Los fragmentos de frondas (100 mg) del helecho fueron presionados suavemente sobre un portaobjetos, para dejar libre a la cianobacteria. Posteriormente, se colocó un cubreobjetos sobre las cianobacterias y se observaron con ayuda de un microscopio de luz (Olympus, modelo BX51, Tokio), sin procedimientos de tinción.

### **8.3.4 Análisis estadístico**

El diseño de los experimentos fue completamente al azar con cinco tratamientos y cuatro repeticiones. Durante las observaciones con microscopía de luz se cuantificó el número de plastidios, y los heterocistos fueron medidos en largo y ancho. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, versión 8.0; SAS Institute Inc., 2002), y se realizó una prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ). Los valores se expresan como promedios  $\pm$  desviación estándar.

## **8.4 RESULTADOS**

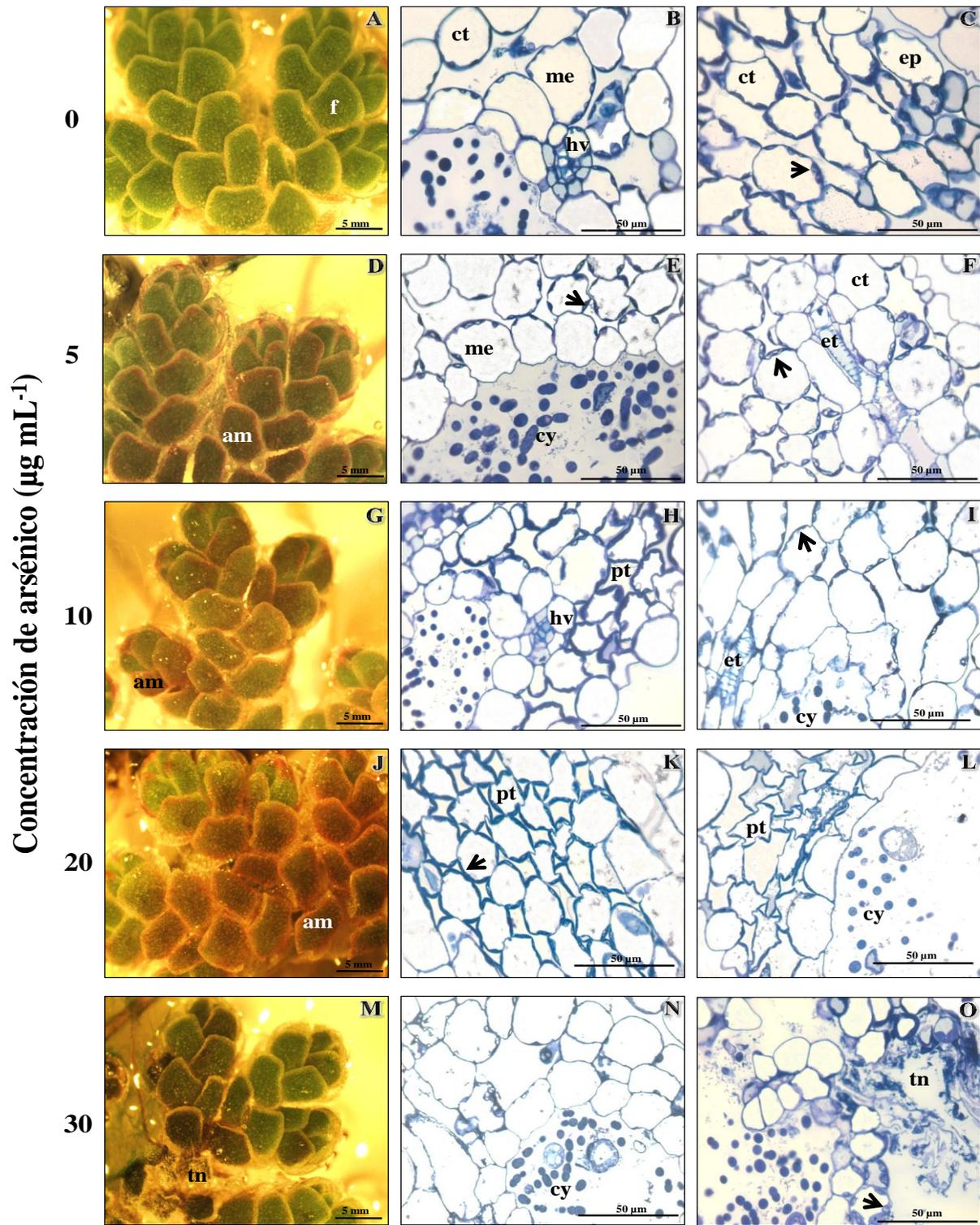
### **8.4.1 Modificación morfo-estructural del simbiosistema *Azolla filiculoides*-*Anabaena azollae* por exposición a arsénico**

Después de 96 h de exposición a dosis crecientes de As el simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae* mostró cambios morfo-estructurales en el helecho y en el cianobionte.

En el caso de *Azolla filiculoides*, el tratamiento testigo ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) presentó una morfología típica y sana, tallo principal ramificado en tallos laterales, frondas verdes flotantes,

turgentes y superpuestas (Figura 8.2 A), con raíces verdaderas. El diámetro de las frondas fue de 0.5 a 2 cm, con raíces filiformes sumergidas de 1 a 5 cm de longitud, en promedio. La estructura interna de las frondas mostró células epidérmicas isodiamétricas de menor tamaño que las células del mesófilo (Figura 8.2 B y C). Las células mostraron paredes y contenidos intactos con cloroplastos (5.1 en promedio) dispuestos en las paredes internas (Cuadro 8.1). A partir de las micrografías, se pudo estimar el área de la superficie de las células de la epidermis la cual estuvo en el intervalo de 500-1000  $\mu\text{m}^2$ . El mesófilo de *Azolla* está formado de parénquima fotosintético no diferenciado en empalizada y esponjoso, recorrido por pequeños haces vasculares con evidente desarrollo de xilema.

Ante bajas concentraciones de As (5 y 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), el ápice de las frondas mostró una coloración de amarillenta a pardo rojiza (Figura 8.2 D y G); el número de plastidios se vió afectado (Cuadro 8.1) y, las células del mesófilo no presentaron cambios aparentes (Figura 8.2 F e I). Mientras que, ante 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , algunas de las células del parénquima presentaron colapso celular. El simbiote no mostró modificaciones estructurales (Figura 8.2 E y H). En las concentraciones de As más altas (20 y 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), la apariencia rojiza y amarillenta fue más evidente y en muchos casos se observó tejido necrosado (Figura 8.2 J y M). En estas concentraciones se observó pérdida de turgencia de las células subepidérmicas, las células de la epidermis abaxial con colapso celular, aparición de células necrosadas y aumento de espacios intercelulares (Figura 8.2 K, L, N y O). Ante 30  $\mu\text{g As mL}^{-1}$  se observó reducción significativa del número de plastidios (2.2 en promedio), con disminución aparente del tamaño y en muchas ocasiones se muestran muy juntos en relación con las demás concentraciones de arsénico evaluadas (Cuadro 8.1).



**Figura 8.2.** Efecto del arsénico en la morfo-estructura de *Azolla filiculoides* expuesta a concentraciones crecientes del metaloide, durante 96 h. Flechas, cloroplastos/plastidios; me, mesófilo; ep, epidermis; ct, célula turgente; et, elemento traqueal; hv, haz vascular; am, coloración amarillento rojiza; tn, tejido necrosado; pt, pérdida de turgencia; cy, cianobacteria; f, frondas

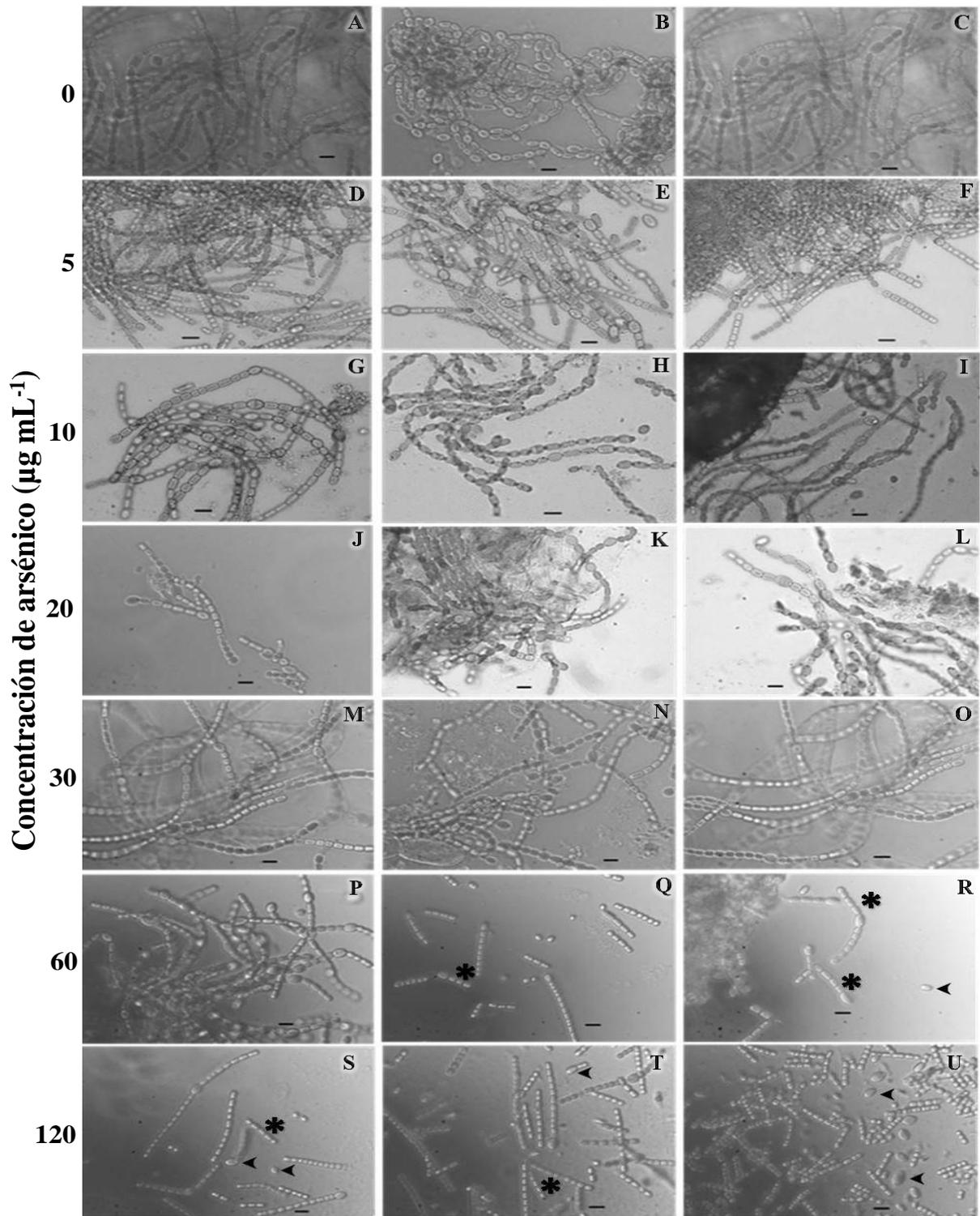
**Cuadro 8.1** Número de plastidios y estructura celular en corte transversal de frondas de *Azolla filiculoides* expuesta a concentraciones crecientes de arsénico en la solución nutritiva, durante 96 h.

Concentración As ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Número de plastidios/célula	Estructura de las células de las frondas
0	$5.1 \pm 1.6$ a	Células turgentes, paredes y contenidos intactos
5	$4.9 \pm 1.1$ a	Células turgentes y paredes celulares intactas
10	$3.9 \pm 2.0$ a	Algunas células presentaron un colapso parcial
20	$4.9 \pm 2.0$ a	Células subepidérmicas de la epidermis abaxial colapsadas
30	$2.2 \pm 0.8$ b	Células dilatadas, reducción significativa de cloroplastos, con regiones de tejido necrosado y pérdida de la organización celular

Valores son medias  $\pm$  desviación estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas entre medias (Tukey  $<0.05$ ).

#### 8.4.2 Modificaciones estructurales de la cianobacteria *Anabaena azollae* por exposición a arsénico

La cianobacteria *Anabaena* mostró modificaciones estructurales debido a la exposición a las diferentes concentraciones de As. El incremento en la concentración de As en la solución nutritiva provocó la formación de cadenas más cortas de células auxiliares y desprendimiento de heterocistos (Figura 8.3) en comparación con el testigo sin aplicación del arsénico (Figura 8.3 A-C). Los efectos más drásticos en la organización celular se observaron en la concentración de  $120 \mu\text{g As mL}^{-1}$  (Figura 8.3 S-U). Aun cuando los heterocistos se desprendieron de las cadenas de las células auxiliares en las concentraciones más altas de As ( $60$  y  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), éstos no mostraron una reducción significativa en su tamaño en comparación con las demás concentraciones y con el testigo (Cuadro 8.2). El tamaño de los heterocistos en todos los tratamientos con As fue en promedio de  $10.9 \mu\text{m}$  de longitud x  $7.4 \mu\text{m}$  de ancho, mientras que en el testigo el promedio fue de  $11.6 \mu\text{m}$  de longitud x  $7.64 \mu\text{m}$  de ancho (Cuadro 8.2).



**Figura 8.3** Cambios estructurales de las células auxiliares de la cianobacteria *Anabaena azollae*, después de 96 h de exposición a concentraciones crecientes de arsénico. Los asteriscos (\*) indican las cadenas de células auxiliares cortas y desorganizadas; las flechas indican los heterocistos desprendidos de las cadenas de células, observados a concentraciones mayores de 30 µg mL<sup>-1</sup>. Barras = 10 µm.

**Cuadro 8.2** Modificación en tamaño de células auxiliares y heterocistos de la cianobacteria *Anabaena azollae*, expuesta durante 96 h a diferentes concentraciones de arsénico.

Concentración de As ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Heterocistos		Células auxiliares	
	Largo ( $\mu\text{m}$ )	Ancho ( $\mu\text{m}$ )	Largo ( $\mu\text{m}$ )	Ancho ( $\mu\text{m}$ )
0	11.61 $\pm$ 0.41	7.64 $\pm$ 0.35	7.35 $\pm$ 0.32	4.65 $\pm$ 0.16
5	11.68 $\pm$ 0.48	7.34 $\pm$ 0.22	7.76 $\pm$ 0.43	5.59 $\pm$ 0.37
10	11.43 $\pm$ 0.23	7.53 $\pm$ 0.25	7.59 $\pm$ 0.28	5.6 $\pm$ 0.14
20	10.49 $\pm$ 0.36	7.33 $\pm$ 0.26	5.92 $\pm$ 0.32	5.21 $\pm$ 0.17
30	11.35 $\pm$ 0.29	7.73 $\pm$ 0.25	7.36 $\pm$ 0.37	5.31 $\pm$ 0.23
60	10.98 $\pm$ 0.34	7.58 $\pm$ 0.22	7.12 $\pm$ 0.39	4.96 $\pm$ 0.17
120	10.01 $\pm$ 0.32	7.14 $\pm$ 0.25	6.85 $\pm$ 0.39	4.35 $\pm$ 0.26

Medias  $\pm$  error estándar. n= 12.

#### 8.4.3 Modificación morfo-estructural del simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae* por exposición a cobre

Los resultados mostraron que al incrementar la concentración de Cu se observaron modificaciones en la morfo-estructura de las dos colectas de *Azolla* (Figuras 8.4 y 8.5).

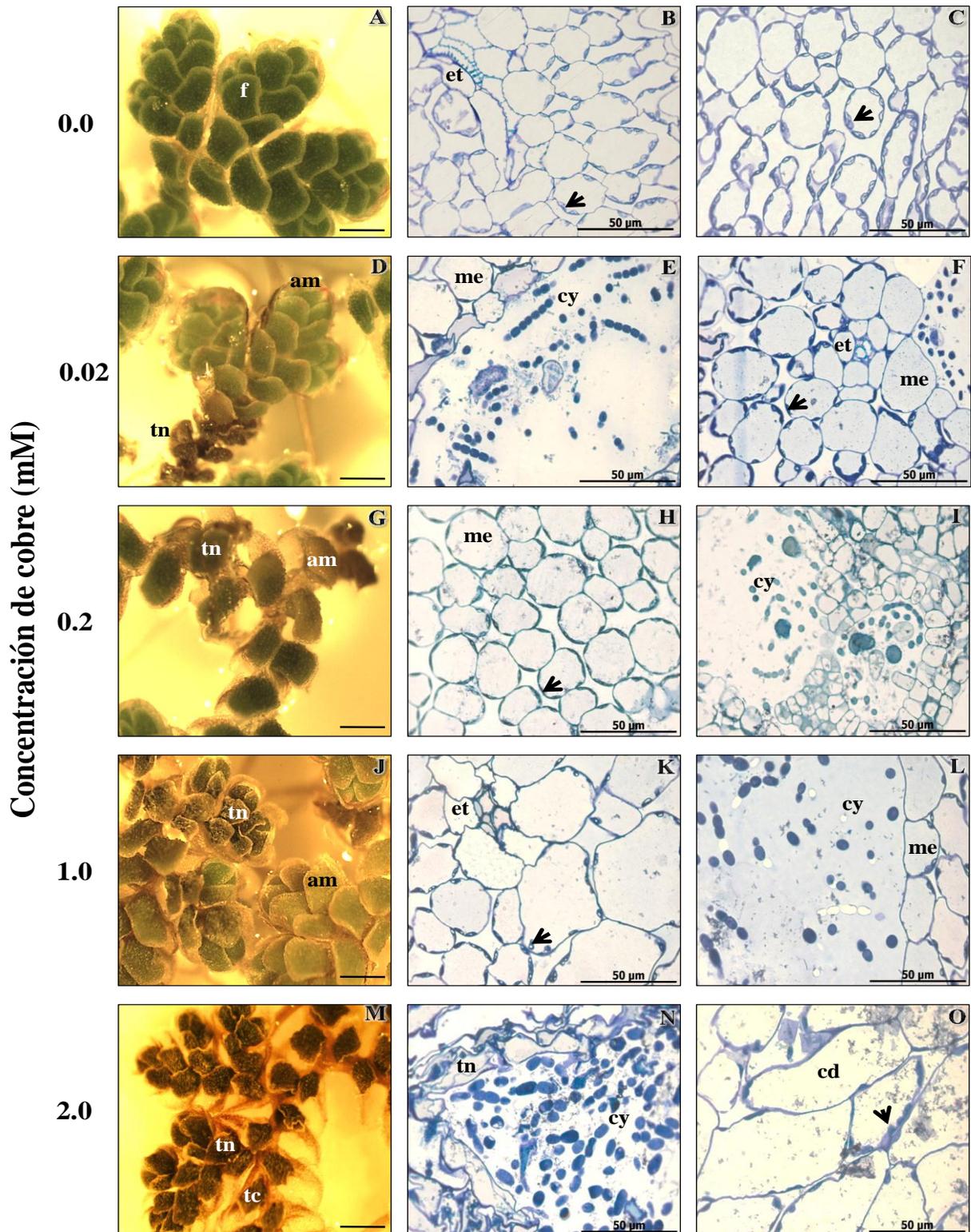
El tratamiento testigo de *Azolla filiculoides* mostró tallos bifurcados sosteniendo frondas verdes y sobrepuestas (Figura 8.4 A). Las células de las frondas fueron turgentes, oblongas con paredes lisas y arregladas en cordones (Figura 8.4 B y C). Los cloroplastos fueron abundantes (5.3 en promedio) y adheridos a las paredes celulares turgentes (Cuadro 8.3). Ante las concentraciones de 0.02 y 0.2 mM de Cu a simple vista el ápice de los lóbulos dorsales de las frondas mostraron coloraciones amarillentas a rojizas (Figura 8.4 D y G). Las células de la cianobacteria alteraron el patrón estructural de cadena, por células individualizadas (Figura 8.4 E e I). Algunas células epidérmicas de las frondas basales del helecho presentaron rasgos de atrofia, disminuyó el número de cloroplastos y otras aumentaron la masa celular comparadas con el testigo (Figura 8.4 E, F, H y I; Cuadro 8.3).

En las concentraciones más altas de Cu (1 y 2 mM) las frondas sufrieron un notable cambio de coloración, su apariencia fue amarillo pardo y rojizas (Figura 8.4 J y M). Ante 1 mM de Cu las frondas presentaron células parcialmente dilatadas y reducción no significativa de cloroplastos (Cuadro 8.3; Figura 8.4 K y L). Mientras que, ante 2 mM de Cu la morfología de las frondas se modificó drásticamente, presentando deformaciones severas, con algunos tejidos necrosados (Figura 8.4 M). Estas modificaciones fueron más evidentes en la cara abaxial (ventral) de las frondas que mostró que el mesófilo de la fronda se contrajo drásticamente dejando la epidermis formando una bolsa translúcida, conteniendo el tejido contraído y necrosado en su interior. Las células del mesófilo perdieron su arreglo, y presentaron colapso, algunas células del mesófilo se dilataron (Figura 8.4 K, L, N, O) con respecto al testigo. Las células subepidérmicas abaxiales disminuyeron significativamente la frecuencia de plastidios (Cuadro 8.3).

**Cuadro 8.3** Número de plastidios por célula y estructura de las células en corte transversal de frondas de *Azolla filiculoides* expuesta a cobre en la solución nutritiva, durante 36 h.

Concentración Cu(mM)	Número de plastidios/célula	Estructura de la células de las frondas
0	5.3 ± 1.5 a	Células turgentes, paredes y contenido intacto
0.02	5.1 ± 1.4 a	Células turgentes y paredes celulares intactas
0.20	4.3 ± 1.8 a	Algunas frondas basales necrosadas, pero la mayoría del tejido con anatomía normal
1.00	4.2 ± 2.0 a	Reducción no significativa de cloroplastos , células parcialmente dilatadas
2.00	2.1 ± 1.1 b	Colapso y necrosis de las células subepidérmicas abaxiales. Marcada dilatación celular y pérdida significativa de plastidios.

Valores son medias ± desviación estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas entre medias (Tukey <0.05).



**Figura 8.4** Efecto de concentraciones crecientes de cobre en la morfo-estructura de *Azolla filiculoides*. Flechas, cloroplastos/plastidios; me, mesófilo; hv, haz vascular; am, coloración amarillento rojiza; tn, tejido necrosado; cy, cianobacteria; di, célula dilatada; tc, tejido contraído; f, frondas; et, elemento traqueal. Barras A, D, G, J y M = 5 mm).

El efecto de la exposición a Cu sobre la morfo-estructura de las frondas de *Azolla caroliniana* se hizo evidente conforme incrementó la concentración de este metal (Figura 8.5). El tratamiento testigo mostró frondas con lóbulos dorsales verdes, y lóbulos ventrales transparentes y turgentes. El mesófilo mostró células isodiamétricas ricas en cloroplastos con cavidades foliares conteniendo cadenas del cianobionte con estructura típica (Figura 8.5 A, B y C; Cuadro 8.4). La exposición a bajas concentraciones de Cu (0.02 y 0.2 mM) provocaron en el helecho síntomas de deshidratación en las frondas basales de las ramas. Los daños morfo-estructurales fueron aumentando con el incremento del Cu en la solución nutritiva. El primer síntoma fue el amarillamiento y obscurecimiento de las frondas, seguido de deshidratación y necrosamiento.

Estos síntomas aparecieron primero en las hojas basales, que son las más maduras (Figura 8.5 D y G). Otros daños observados fueron el aumento en el tamaño celular, el cambio de forma y la disminución en la población de los plastidios (Figura 8.5 E, F, H e I; Cuadro 8.4). En general, las células de *A. caroliniana* sufrieron colapso y lisis a medida que se incrementó la dosis de Cu. El caso más extremo se observó ante las concentraciones más altas del metal (1 y 2 mM) con frondas deshidratadas, células contraídas y aumento de tamaño (Figura 8.5 J, K, L, M, N y O). A medida que aparecieron estas alteraciones, disminuyó el número de plastidios y las células aparentemente viables (Cuadro 8.4).

Ante la concentración más alta de Cu (2 mM) se observó tejido necrosado el cual aumentó de forma constante hasta el final del periodo experimental (36 h). *Azolla caroliniana* modificó el tamaño de las células y las zonas con necrosis alcanzaron hasta un 90% de los tejidos. En algunas zonas se observaron células en degeneración y órganos encapsulados junto con plastidios (Figura 8.5 N y O; Cuadro 8.4).

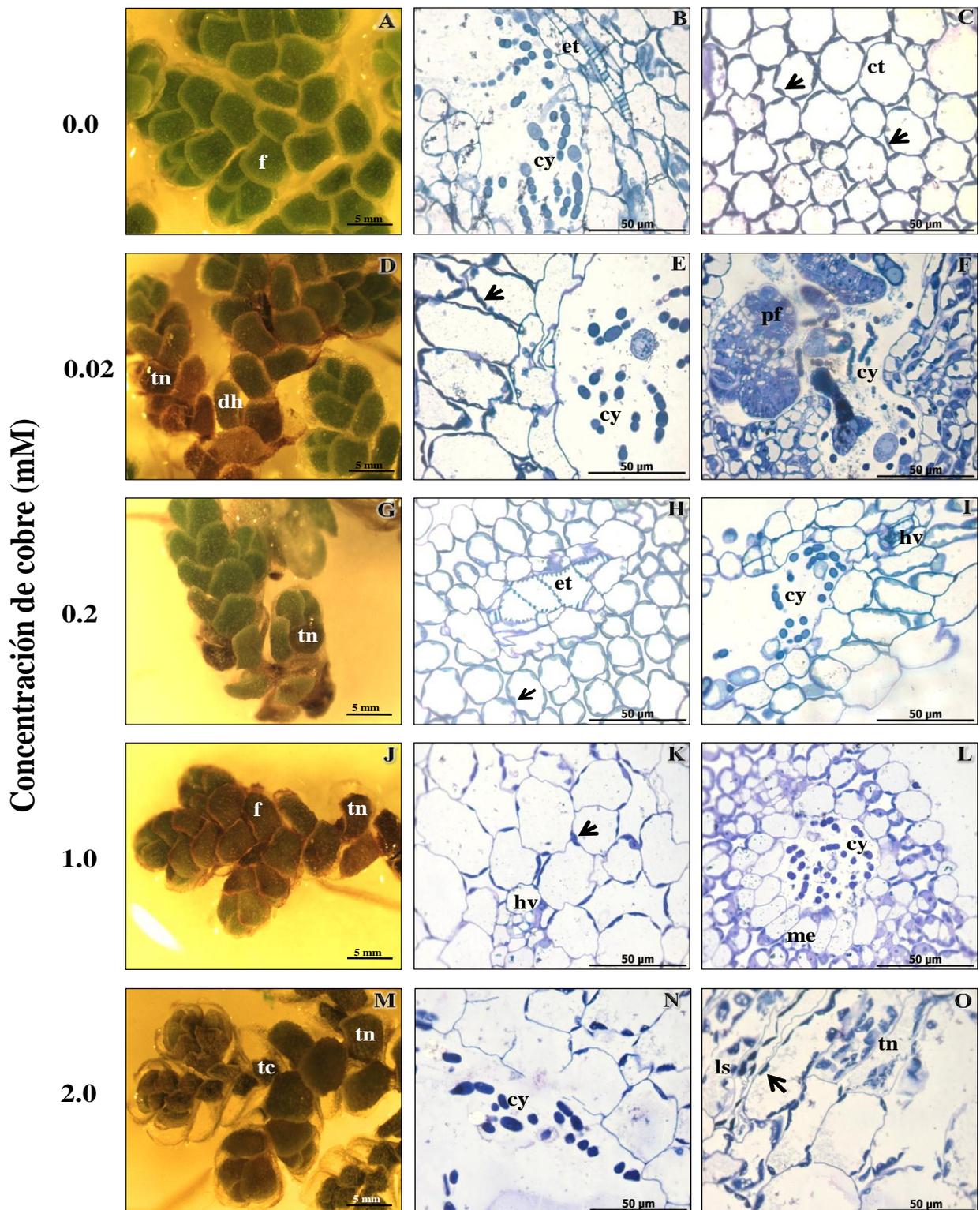


Figura 8.5 Efecto de concentraciones crecientes de cobre en la morfo-estructura de *Azolla caroliniana*. Flechas, cloroplastos/plastidios; me, mesófilo; hv, haz vascular; cy, cianobacteria; dh, deshidratación; tn, tejido necrosado; ct, tejido contraído; pf, primordios foliares; f, frondas; et, elemento traqueal.

**Cuadro 8.4** Número de plastidios por célula y estructura de las celular en corte transversal de frondas de *Azolla caroliniana* expuesta a cobre en la solución nutritiva, durante 36 h.

Concentración Cu (mM)	Número de plastidios/célula	Estructura de las células de las frondas
0	6.0 ± 0.8 a	Estructura preservada, células turgentes y paredes intactas
0.02	5.8 ± 1.4 a	Estructura preservada, inducción de primordios foliares
0.2	5.2 ± 1.3 a	Células turgentes, población de plastidios intacta
1.0	3.8 ± 1.6 b	Disminución significativa de plastidios, dilatación celular
2.0	2.8 ± 1.5 b	Dilatación celular, rompimiento de paredes y desorganización interna y necrosis.

Valores son medias ± desviación estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas entre medias (Tukey <0.05).

## 8.5 DISCUSIÓN

Los resultados de los análisis morfo-estructurales de las frondas de *Azolla filiculoides* y *Azolla caroliniana* mostraron que los daños celulares producidos por el As y Cu estuvieron en función de la concentración del metaloide y del metal pesado en la solución nutritiva. Las alteraciones del metabolismo normal de los helechos, se reflejaron en las modificaciones estructurales. Algunos de los síntomas foliares (deshidratación, coloración parda) y cambios morfo-estructurales (colapso y necrosis) a concentraciones crecientes de As y Cu coinciden con lo descrito en helechos expuestos a Cd, Pb, Ag (Bondana *et al.*, 2004; Sela *et al.*, 2005).

Las micrografías de las células epidérmicas del lóbulo ventral de las frondas basales de ambas colectas de *Azolla* mostraron los cambios morfo-estructurales mayores, lo que indica que el daño celular inicia en la base de la fronda y avanza en dirección al ápice (acropeto) (Figura 8.2, 8.4 y 8.5).

En *Azolla filiculoides* expuesta a As se observó coloración amarillenta a rojiza en el ápice de frondas jóvenes y en frondas basales (Figura 8.2). Este cambio de coloración puede

ser atribuido a que algunos organelos celulares tales como mitocondrias o retículo endoplásmico sufrieron muerte local por la toxicidad del metaloide y fueron digeridos por enzimas lisosómicas y al no ser expulsados, se formaron gránulos de lipofucsina que se observaron como pigmentos amarillos pardo. La lipofucsina es llamada “pigmento de desgaste”, y al alcanzar una concentración suficiente se pudo haber producido la coloración parda del tejido, a lo cual se ha llamado atrofia parda (Sela *et al.*, 2005; Marcano *et al.*, 2010). El incremento en la concentración de As (20 y 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) evidenció áreas totalmente necrosadas y tejidos con atrofia parda. El mecanismo de acción del As es mediante la inhibición de la actividad enzimática mitocondrial, los arsenatos sustituyen a los grupos fosfato de los cofactores enzimáticos necesarios en la actividad de la piruvato deshidrogenasa dentro del ciclo de Krebs, perturbando la transformación de la tiamina a acetil-CoA y succinil-CoA. En consecuencia, el As inhibe la fosforilación oxidativa y con ello la respiración celular por lo que se produce un fallo multiorgánico (Matschullat, 2000; Zhao *et al.*, 2002).

Colateralmente se muestran evidencias sobre los cambios estructurales que sufre la cianobacteria *Anabaena azollae* provocados por las concentraciones de As. En este sentido, la exposición a concentraciones elevadas de As dio lugar a cadenas más cortas de las células auxiliares con desprendimiento de heterocistos en la cianobacteria (Figura 8.3). Estos cambios estructurales en *Anabaena* se han reportado cuando se expone a hidrocarburos policíclicos aromáticos, como el fenantreno (Castro-Carrillo *et al.*, 2008). Romero *et al.* (2002) reportan que el Cd incrementa el volumen celular de dos microalgas (*Tetraselmis* sp. y *Chaetoceros* sp), incrementando la capacidad de adherir el Cd a la superficie de la pared celular, y formar agregados celulares que floculan. En esta propiedad singular se han fundado el desarrollo de las técnicas de inmovilización celular por adsorción. Por su parte, Huang *et al.* (2009) demostraron la inhibición significativa del crecimiento de las células de *Chlorella vulgaris* al

exponerla a 80  $\mu\text{M}$  de Cd o Zn. Estas investigaciones muestran cómo la exposición a metales pesados induce cambios morfológicos en ciertos microorganismos; sin embargo, no se tienen reportes sobre el efecto del As en la fisiología o la estructura del cianobionte *Anabaena*. Al revisar el tamaño celular de *Anabaena azollae* no se detectaron cambios en el tamaño pero si en su tendencia a formar cadenas cortas.

*Azolla* es un helecho acuático, que forma una simbiosis permanente y hereditaria con la cianobacteria *Anabaena azollae* (Espinoza y Gutiérrez, 2003), cuya relación mutualista es la única conocida en la naturaleza entre una pteridofita y un procariote diazotrófico. *Anabaena azollae* se aloja en la cavidad del lóbulo clorofílico de la fronda (Van-Hove y Lejeune, 2002) y tiene la capacidad de fijar el N atmosférico en los sistemas acuáticos (Quintero-Lizaola y Ferrera-Cerrato, 2000). En el simbiosistema *Azolla-Anabaena* ocurre un intercambio de compuestos nitrogenados desde la cianobacteria hacia el hospedero y en vía contraria, los productos fotosintéticos (Mayz-Figueroa, 2004).

En las frondas de *Azolla filiculoides* (Figura 8.4) y *Azolla caroliniana* (Figura 8.5) se observó que la exposición a concentraciones crecientes de Cu provocó cambios de coloración y vacuolización celular en comparación con el testigo, y estas características fueron generalizadas para los dos helechos. Las frondas de ambas especies sometidas a las concentraciones más altas de Cu (1 y 2 mM) mostraron deshidratación, muerte celular y zonas con atrofia parda y necrótica. La atrofia parda y necrosada se representó por la disminución del tamaño y el volumen de las células individuales, lo que podría estar asociado a los daños en el ciclo de Krebs que promovió muerte celular. En la microalga *Scenedesmus* sp produjeron alteraciones ultraestructurales asociadas a la reducción en la síntesis de proteínas estructurales y el aumento del catabolismo (Marcano *et al.*, 2010).

La tolerancia que mostró *Azolla filiculoides* (Figura 8.4) a bajas concentraciones de Cu (0.02 y 0.2 mM) puede estar relacionada con el aislamiento del metal del metabolismo de la célula, que puede ser por acumulación del metal en la pared celular, o por fitoquelatinas de fórmula  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  (Rauser, 1995; Benaroya *et al.*, 2004). El transporte del Cu en las frondas de *Azolla* puede estar relacionado con proteínas específicas de bajo peso molecular, similares a las metaloproteínas a través de las membranas biológicas semipermeables (Smadar y Chefetz, 2011).

*Azolla filiculoides* ante altas concentraciones de Cu (1 y 2 mM) sufrió cambios morfo-estructurales, en las células epidérmicas y en las células del mesófilo que pueden considerarse como síntomas de toxicidad por Cu. Schor-Fumbarov *et al.* (2005) y Smadar y Chefetz (2011) reportan que el estrés por exposición a metales (Ag, Pb y Cu) en *Azolla filiculoides* provoca transformaciones a nivel celular y aumenta la secreción de metaloproteínas, pectinas y compuestos antioxidantes, los cuales pueden actuar como agentes reductores de metales y participar como mecanismo de defensa contra una posible lisis celular. Además estas investigaciones reportan también cambios morfo-estructurales asociados con el incremento de la vacuolización, la desorganización del parénquima, el aumento de grosor de los capilares, y el aumento en la basofilia citoplasmática (células con abundantes ribosomas, con un grado de maduración intermedia).

Los resultados del presente trabajo mostraron que *Azolla caroliniana* presentó modificaciones estructurales en las células del parénquima (Figura 8.5). Todas estas modificaciones son indicativas del efecto negativo del Cu sobre el helecho. Bondana *et al.* (2004), establecen que el Cu produce inhibición en la formación de  $\text{ATPase Na}^{+2} - \text{K}^{+2}$  originando un incremento del sodio intracelular lo cual ocasiona retención de agua, disminución de plastidios en relación directa con las áreas necróticas, hipertrofia del tejido

epidérmico de la periferia de las frondas y muerte de células epidérmicas de las frondas que redujeron el número de células funcionales. La desorganización y disminución de los cloroplastos se relaciona con la disminución de pigmentos fotosintéticos (Ver Capítulo VI), y la fijación de CO<sub>2</sub> (Tyystjärvi, 2008).

Ante concentraciones bajas del Cu las células de las frondas de *Azolla caroliniana* se vieron afectadas en diversos grados, desde modificaciones morfo-estructurales leves, perturbaciones del metabolismo celular, la afectación en la actividad fotosintética (Ver Capítulo VI), hasta la muerte celular ante altas concentraciones del metal (Figura 8.5). El Cu sólo es limitante para la fotosíntesis en concentraciones menores de 0.1 µM, pero en concentraciones de 50 µM presenta un efecto tóxico al provocar la disminución de la concentración de plastocianina y de clorofila, posiblemente por el daño ocasionado a las membranas del tilacoide (Addel-Ghany y Elchaghaby, 2007). En investigaciones de Shen-Gen *et al.* (2005) reportaron que la superficie de las frondas en *Azolla imbricata* exponen una mayor área de contacto con el agua, favoreciendo la adsorción de los cationes a la pared celular. Un mecanismo similar pudiera presentarse en *Azolla caroliniana* y *Azolla filiculoides*.

A nivel tisular, se observaron cambios morfo-estructurales en la cianobacteria y en el helecho *Azolla*, lo que puede tomarse como indicadores de la toxicidad provocada por metales y metaloides. Nicolaus *et al.* (1999) y Oren-Benaroya *et al.* (2004) proponen que estos cambios se dan como resultado de alteraciones bioquímicas y fisiológicas en los organismos, por lo que el tejido se transformará para tratar de mantener su homeostasis. Si el estrés es continuo provocará cambios en la estructura de los tejidos u órganos indicando la citotoxicidad en el simbiosistema. En el presente estudio los efectos se aprecian en una secuencia de cambios desde el amarillamiento, obscurecimiento, deshidratación, colapso celular y muerte (observados como necrosis).

## 8.6 CONCLUSIONES

El aumento en las concentraciones de As o Cu induce cambios en la morfo-estructura de *Azolla filiculoides* y *Azolla caroliniana*, caracterizada por atrofia parda, cambios en la forma celular, deshidratación del tejido, colapso y muerte celular observada como necrosis.

El cianobionte *Anabaena azollae* sufre cambios estructurales provocados por concentraciones superiores a 60  $\mu\text{g As mL}^{-1}$  o 1.0 mM de Cu, caracterizados por heterocistos individuales y cadenas de células auxiliares más cortas y desorganizadas.

Las especies *Azolla filiculoides* y *Azolla caroliniana* presentan mecanismos de adaptación morfo-estructurales al estrés causado por el Cu, por no presentar daños celulares a concentraciones bajas de Cu (0.02 y 0.2 mM), lo que sugiere su posible utilización como biotecnología de limpieza de agua contaminada con Cu.

*Azolla filiculoides* presenta mayores modificaciones morfo-estructurales que *Azolla caroliniana* bajo el efecto de concentraciones bajas de Cu (0.02-1.0 mM), e incremento de incidencia de necrosis en concentraciones de 2.0 mM de Cu.

## CAPÍTULO IX

### CONCLUSIONES GENERALES

- A partir de las cuatro especies (*A. filiculoides*, *A. caroliniana*, *A. mexicana* y *A. microphylla*) identificadas taxonómicamente por técnicas moleculares y mantenidas *in-vivo* en el *Azollatum* “Alfredo Echegaray Alemán”, se seleccionaron *Azolla filiculoides* (ENS) y *Azolla caroliniana* (CEG) para evaluar la acumulación y los mecanismos de tolerancia ante arsénico y cobre, por ser especies reportadas en la literatura como hiperacumuladoras de metales pesados y metaloides.

- *Azolla filiculoides* presentó estimulación de crecimiento (47%) a concentraciones menores a 30  $\mu\text{g As mL}^{-1}$ , y capacidad de acumular hasta 28  $\mu\text{g As g}^{-1}$ , denotando su tolerancia a este metaloide. Las concentraciones de arsénico superiores a 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  inducen toxicidad en el helecho manifestado al disminuir su crecimiento (50%), el contenido de clorofila, la actividad antioxidante, el contenido total de compuestos fenólicos, e inducir incrementos en el contenido de carotenoides totales + xantofilas.

- Los análisis mediante XRF fue una técnica no invasiva y permitieron determinar que el incremento en la concentración de As en la solución nutritiva induce la disminución en los contenidos de S, K, Mn, Fe y Zn causando desbalances en la concentración elemental de las frondas de *Azolla filiculoides*.

- El aumento en las concentraciones de As (20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) induce cambios en la morfo-estructura de *Azolla filiculoides* caracterizada por atrofia parda, cambios en la forma celular, deshidratación del tejido, colapso y muerte celular observada como necrosis.

- Los efectos negativos del Cu (1 y 2 mM) sobre el aparato fotosintético en *Azolla filiculoides* y *Azolla caroliniana* son una rápida inactivación del fotosistema II al

reducir el rendimiento fotoquímico (50-65%), y ejerciendo daños en la permeabilidad de la membrana (fuga de electrolitos).

- La acumulación de  $\text{Cu}^{2+}$  en las frondas de *Azolla filiculoides* y *Azolla caroliniana* tiene un impacto negativo en la homeostasis elemental de ambos helechos. Sin embargo, *Azolla filiculoides* presenta una menor disminución en los contenidos de Al, P, Zn, Mn, Fe y Ca en comparación con *A. caroliniana*; mientras que, *A. caroliniana* concentra de manera más eficaz S, Cl y K. Lo anterior permite documentar que independientemente de las diferencias en la capacidad de bioacumulación de  $\text{Cu}^{2+}$  entre ambas especies de *Azolla*, éstas pueden tener aplicación biotecnológica en la limpieza de aguas contaminadas con Cu.

- Los helechos *Azolla filiculoides* y *Azolla caroliniana* presentan mecanismos de adaptación morfo-estructurales al estrés causado por el Cu, por no presentar daños celulares a concentraciones bajas de Cu (0.02 y 0.2 mM) lo que sugiere su posible utilización como biotecnología de limpieza de agua contaminada con Cu. Sin embargo, *Azolla caroliniana* conserva mejor la estructura celular ante concentraciones altas de Cu (1 y 2 mM), en comparación con *Azolla filiculoides*.

- El cianobionte *Anabaena azollae* mantiene su estructura celular en concentraciones menores a  $20 \mu\text{g As mL}^{-1}$  y 1 mM Cu. La toxicidad de As y Cu en la cianobacteria se manifestó en cadenas más cortas y heterocistos individuales.

- De acuerdo con la clasificación del valor del FBC (Zayed *et al.*, 1998) las colectas de *Azolla filiculoides* y *Azolla caroliniana* evaluadas en esta investigación no se podrían considerar como hiperacumuladoras de As y/o Cu. Sin embargo, ambos helechos presentan la capacidad de crecer, absorber y acumular estos elementos potencialmente tóxicos en sus tejidos.

## CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados de este trabajo mostrados en los capítulos anteriores, permiten proponer que el simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae* presenta mecanismos fisiológicos activos de tolerancia a concentraciones menores de  $30 \mu\text{g As mL}^{-1}$  y menores de  $1 \text{ mM Cu}$ , para contrarrestar los posibles efectos negativos en la morfo-estructura del helecho, que pueden ser útiles en la destoxificación de aguas contaminadas con los elementos potencialmente tóxicos que se evaluaron. Aunque algunos de los mecanismos de tolerancia del simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae* ante As y Cu han sido estudiados en el presente trabajo, aún se requiere mayor investigación para entender las complejas interrelaciones entre los elementos potencial tóxicos, el ambiente y el simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae* que resultan en efectos benéficos para el simbiosistema y los ambientes acuáticos.

A partir de los resultados de esta investigación, *Azolla filiculoides* y *Azolla caroliniana* exhiben la capacidad potencial para ser utilizadas en procedimientos de fitoestabilización de As y Cu para aguas contaminadas y, finalmente pueden ser capaces de reducir los riesgos ambientales de estos contaminantes. Además, no se debe excluir posibles desarrollos biotecnológicos que comprendan el uso de la biomasa de *Azolla* como biosorbente de elementos preciosos, que podría llegar al desarrollo adicional de tecnologías para aguas contaminadas con metaloides y metales pesados.

El simbiosistema *Azolla-Anabaena* es una alternativa de destoxificación de aguas contaminadas. Sin embargo, falta explorar su aplicación biotecnológica para la destoxificación de aguas contaminadas de origen agropecuario, tales como las aguas residuales de los planteles lecheros, porcinos, avícolas y agroindustrias, que se caracterizan por sus cargas altas de metales pesados, materia orgánica, sólidos en suspensión, y nutrientes.

Las tendencias de investigación deberían enfocarse principalmente al aislamiento y a la selección *in-situ* de especies de *Azolla* con capacidad de remoción, acumulación y degradación de hidrocarburos, plaguicidas y metales pesados. En este contexto, poco se sabe sobre el uso de microorganismos de la rizosfera de helechos acuáticos para mejorar la absorción de metales pesados y metaloides por las plantas en el agua, por lo que se considera que una alternativa para incrementar la capacidad del simbiosistema de *Azolla-Anabaena azollae* durante el proceso de fitoextracción o rizofiltración, puede ser la selección y utilización de microorganismos de la rizosfera de *Azolla* que sean tolerantes a elementos potencialmente tóxicos que mejoren los procesos de destoxificación de aguas contaminadas.

En México, aún no se documenta ninguna experiencia en especies de *Azolla* nativas, con capacidad de acumulación de metales pesados o metaloides. Los estudios realizados en otros países generan sin duda una motivación para que en México se realice investigación con este promisorio helecho, mismo que puede considerarse como una excelente opción para mantener la sostenibilidad de los ecosistemas acuáticos, disminuyendo tanto el suministro de insumos externos como la contaminación del ambiente. Así, el simbiosistema *Azolla-Anabaena* es un valioso elemento para la implementación de tecnologías limpias, que son económica y ecológicamente sostenibles.

## LITERATURA CITADA

- Adams, D.G., B., Bergman, S.A. Nierzwicki-Bauer, A.N. Rai, A. Schübler, "Cyanobacterial-Plant Symbioses", en *Prokaryotes*, vol. 1, 331-363, 2006.
- Addel-Ghani, N.T., G.A., Elchaghaby, "Influence of operating conditions on the removal of Cu, Zn, Cd and Pb ions from wastewater by adsorption", en *International Journal Environment Science and Technology*, vol. 4, 451-456, 2007.
- Anjos, M.J., R.T., López, E.F., Jesus, S.M., Simabuco, R., Cesareo, "Quantitative determination of metals in radish using x-ray fluorescence spectrometry", en *X-Ray Spectrometry*, vol. 31, 120-123, 2002.
- Aguilar, I.A., E.R. Pérez, "La contaminación agrícola del agua en México: Retos y perspectivas. Problemas del Desarrollo", en *Revista Latinoamericana de Economía*, vol. 39, 205-215, 2008.
- Aguilar, V., "Aguas continentales y diversidad biológica de México: Un recuento actual", en *Biodiversitas*, vol. 48, 1-15, 2003.
- Ahmad, M.S.A., M., Hussain, S., Ijaz, A.K., Alvi, "Photosynthetic performance of two mung bean (*Vigna radiata* (L.)wilczek) cultivars under lead and copper stress", en *Journal Agricultural Biological*, vol. 10, 167-172, 2008.
- Antunes, P. M., G.M., Watkins, J.R., Duncan, "Batch studies on the removal of gold (III) from aqueous solution by *Azolla filiculoides*", en *Biotechnology Letters*, 23, 249-251, 2001.
- Arora, A., S. Saxena, K. Sharma, "Tolerance and phytoaccumulation of Chromium by three *Azolla* species" en *Journal Microbiology Biotechnology*, vol. 22, 97-100, 2005.
- Arroyave, M.P., "La lenteja de agua (*Lemna minor* L.): Una planta acuática promisoría", en *Revista Escuela de Ingeniería de Antioquía*, ISSN 1794-1237, vol. 1, 33-38, 2004.
- ATDSDR (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades), "Reseña toxicológica del zinc", Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los E.E.U.U. Servicio de Salud Pública, 65 pp., 2006.
- Bačkor, M, P., M., Váczi, J., Barták, A., Budová, A. Dzubaj, "Uptake, photosynthetic characteristics and membrane lipid peroxidation levels in the lichen photobiont *Trebouxia erici* exposed to copper and cadmium", en *Bryologist*, vol. 110, 100-107, 2007.
- Barrueco, C.R., F.S. García, P. Subramaniam, "La fijación de Nitrógeno atmosférico", en *Temas de divulgación. Instituto de recursos Naturales y Agrobiología*, vol. 1, 1984.
- Becking, J.H., "Nitrogen fixation by the *Azolla-Anabaena* symbiosis", en *Proceeding of International Atomic Energy Agency. The role of isotopes in studies on nitrogen fixation and nitrogen cycling by blue-green algae and the Azolla-Anabaena azollae association*", IAEA, TECDOC 325. Vienna, Austria, 53-61, 1986.
- Benaroya, O.R., V. Tzin, E. Tel-Or, E. Zamski, "Lead accumulation in the aquatic fern *Azolla filiculoides*", en *Plant Physiology Biochemistry*, vol. 42, 639-645, 2004a.
- Benaroya, R.O., E., Zamski, E., Tel-Or, "L-Myo-inositol 1-phosphate synthase in the aquatic fern *Azolla filiculoides*", en *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 42, 97-102, 2004.
- Bennicelli, R., Z. Stepniewska, A. Banach, K. szajnocha, J. Ostrowski, "The ability of *Azolla caroliniana* to remove heavy metals (Hg(II), Cr(III), Cr(VI)) from municipal waste water", en *Chemosphere*, vol. 55, 141-146, 2004.
- Bjorkman, O., B., Demmig, "Photon yield of O-2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77-K among vascular plants of diverse origins", en *Planta*, vol. 170, 489-504, 1987.
- Blanco, D., B. Llanos, N.A. Cuizano, H. Maldonado, A.E. Navarro, "Optimización de la adsorción de cadmio divalente en *Lessonia trabeculata* mediante reticulación de CaCl<sub>2</sub>", en *Revista de la Sociedad Química del Perú*, vol. 71, 237-245, 2005.
- Bold, H.C., C.J. Alexopoulos, Th., Delevoryas "Morfología de las Plantas y los Hongos. Omega, Barcelona, 911 pp., ISBN 84-282-0754-2, 1989.

- Bondana, B.R., S., Tu, L.Q. Ma, "Absorption of foliar-applied arsenic by the arsenic hyperaccumulating fern (*Pteris vittata* L.)", en *Science of the Total Environment*, 332, 61-70, 2004.
- Brooks, R.R., "Phytochemistry of hyperaccumulators", en Brooks R.R., (ed), *Plants that hyperaccumulate heavy metals—their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytomining*, New York (NY): CAB International, pp. 15-54, 1998.
- Bruce S.L., B.N., Noller, A.H., Grigg, B.F., Mullen, D.R., Mulligan, P.J., Ritchie, "A field study conducted at kidston gold mine to evaluate the impact of arsenic and zinc from mine tailing to grazing cattle", en *Toxicology Letter*, vol. 137, 23-34, 2003.
- Butler, W.L., M., Kitajima, "Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts", en *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 376, 116-125, 1975.
- Byung-Eun, K., T., Nevitt, D.J., Thiele, "Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation", en *Nature Chemical Biology*, vol. 4, 176-186, 2008.
- Cai, Y., J., Su, L.Q., Ma, "Low molecular weight thiols in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* upon exposure to arsenic and other trace elements", en *Environmental Pollution*, vol. 129, 69-78, 2004.
- Cakmak, I. "Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species", en *New Phytologist*, 146, 185-205, 2000.
- Cao, X., L. Ma, A. Shirallpour, W. Harris, "Biomass reduction and arsenic transformation during composting of arsenic-rich hyperaccumulator *Pteris vittata* L.", en *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 17, 586-594, 2010.
- Carrapico, F., "Is the *Azolla-Anabena* symbiosis a co-evolution case ?", en *General Botany: Traditions and Perspectives*, A. Sitnykov, Materials of the International Conference, Published by the Kazan University, Russia, vol. 1, 193-195, 2006.
- Carrapico, F., "The *Azolla-Anabaena*-bacteria system as a natural micro-cosm", en *Proceeding of SPIE*, vol. 4495, 261-265, 2001.
- Carrapico, F., A.L. Pereira, "How evolved is the *Azolla-Anabaena* symbiotic system?", en *Book of Abstracts of the XVII International Botanical Congress*, Vienna, 132 pp., 2005.
- Carrapico, F., G. Teixeira, A.A. Diniz, "Azolla as a biofertiliser en Africa. A challenge for the future", en *Revista de Ciencias Agrarias*, vol. 23, 120-138. 2000.
- Castro-Carrillo, L.A., J., Delgadillo-Martínez, R., Ferrera-Cerrato, A., Alarcón, "Phenanthrene dissipation by *Azolla caroliniana* utilizing bioaugmentation with hydrocarbonoclastic microorganisms", *Interciencia*, vol. 33, 1-7, 2008.
- Celis, H.J., M.J. Junod, E.M. Sandoval, "Recientes aplicaciones de depuración de aguas residuales con plantas acuáticas", en *Theoria*, ISBN 0717-196X, vol. 14, 17-25, 2005.
- Chao-Yang, W., C., Tong-Bin, "Arsenic accumulation by two brake ferns growing on arsenic mine and their potential in phytoremediation", en *Chemosphere*, vol. 63, 1048-1053, 2006.
- Chen, C.W., C.M., Kao, C.F., Chen, C.D., Dong, "Distribution and accumulation of heavy metals in the sediments of Kaohsiung Harbor, Taiwan", en *Chemosphere*, vol.66, 1431-1440, 2007.
- Chojnacka, K., "Biosorption and bioaccumulation-the prospects for practical applications", en *Environment International*, vol. 36, 299-307, 2005.
- CNA (Comisión Nacional del Agua), "Estadísticas del agua en México", México, vol. 1, pp.106, 2005.
- Cobbett, C., P., Goldsbrough, "Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis", en *Annual Review Plant Biology*, 53, 159-182, 2002.
- Coca, C.P., Rosique J.J., "Ciencia de Materiales, Teoría-Ensayos-Tratamientos", Ed. Pirámide. ISBN 84-368-0404-X, 2000.
- Cohen, M.F., H. Yamasaki, M. Mazzola, "Biorremediation of soils by plant-microbe systems", en *International Journal of Green Energy*, vol. 1, 301-312, 2004.
- Cortinas, C., C. Mosler, "Gestión de residuos peligrosos", en UNAM, México, vol. 1, 124 pp., 2005.
- COSEWIC, "Assessment and update status report on the Mexican Mosquito-fern *Azolla mexicana* in Canada", en *Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada*.Ottawa, 35 pp. (www.sararegistry.gc.ca/status/status\_e.cfm), 2008.

- Diario Oficial de la Federación, “Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamiento a que debe someterse el agua para su potabilización. 22 de noviembre de 2000.
- Duan, G.L., Y., Zhou, Y.P., Tong, R., Mukhopadhyay, B.P., Rosen, Y.G., Zhu, “A CDC25 homologue from rice functions as an arsenate reductase”, en *New Phytologist*, vol. 174, 311–321, 2007.
- Duque, J.J., S.L.E. Llano, V.A. Hernando, “Estructura cristalina del cobre, propiedades microscópicas mecánicas y procesamiento”, en *Ciencia Ingeniería Neogranadina*, vol. 16, 2007.
- Earnshaw, P., W. Greenwood, “Chemistry of the elements”, 1600 pp., 1997.
- EPA (United States Environmental Protection Agency), “Determination of trace elements in water and wastes by inductively coupled plasma-mass spectrometry”, Method 200.8 Revision 5,4–Creed, J.T., C.A., Brockhoff, T.D. Martin, U.S., Environmental Protection Agency Cincinnati, OHIO 4568, 57 pp, 1994.
- Espinoza, Y., “Potencial de *Azolla Anabaena* como biofertilizante para cultivos de arroz”, en *Revista digital del centro nacional de investigaciones agropecuarias de Venezuela CENIAP*, vol. 6. 2004.
- Espinoza, Y., R. Gutiérrez, “Caracterización morfo-anatómica y agronómica de accesiones de *Azolla* en Venezuela”, en *Revista de la Facultad de Agronomía*, vol. 23, 135-150, 2004.
- Espinoza, Y., R., Gutiérrez, “Intra-specific variability in *Azolla filiculoides* collected in the west-center of Venezuela”, en *Revista de la Facultad de Agronomía*, vol. 20, 156-167, 2003.
- Evrard, C., C. Van-Hove, “Taxonomical of the American *Azolla* species (Azollaceae)”, en *A Critical Reviews in System Geography Plants*, vol. 74, 301-318, 2004.
- Feldman-Salit, A., M., Wirtz, R., Hell, R.C., Wade, “A mechanistic model of the cysteine synthase complex”, en *Journal of Marine Biology*, vol. 386, 37-59, 2009.
- Ferentinos, L., H.J. Smith, Valenzuela, “*Azolla*”, en *Sustainable agriculture green manure crops*, Cooperative Extension Service, University of Hawaii, SA-GM-2, 3 p., 2002.
- Ferrera-Cerrato, R., N.G. Rojas-Avelizapa, H.M. Poggi-Varaldo, A. Alarcón, R.O. Cañizares-Villanueva, “Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos” en *Reviews Letter Microbiology*, vol. 48, 179-187, 2006.
- Forni, C., A., Cascone, M., Fioric, L., Migliorea, “Sulphadimethoxine and *Azolla filiculoides* Lam.: a model for drug remediation”, en *Water Research*, vol. 36, 3398-3403, 2002.
- Forni, C., J., Chen, L., Tancioni, M.G., Caiola, “Evaluation of the fern *Azolla* for growth, nitrogen and phosphorus removal from wastewater”, en *Water Research*, vol. 35, 1592-1598, 2001.
- Francesconi, K., P., Visoottiviseth, W., Sridokchan, W., Goessler, “Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils”, en *Science of the Total Environment*, vol. 284, 27-35, 2002.
- Garbisu, C., J., Hernandez-Allica, O., Barrutia, I., Alkorta, J.M., Becerril, “Phytoremediation: a technology using green plants to remove contaminants from polluted areas”, en *Review Environment Health*, vol. 17, 173-188, 2002.
- Gardea-Torresdey, J.L., J.R., Peralta-Videa, M., Montes, G., De la Rosa, B., Corral-Díaz, “Bioaccumulation of cadmium, chromium and copper by *Convolvulus arvensis* L.: impact on plant growth and uptake of nutritional elements”, en *Bioresource Technology*, 92, 229-235. 2004.
- Ghosh, M., S.P., Singh, “A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts”, en *Applied Ecology and Environmental Research*, vol. 3, 1-18, 2005.
- Ginocchio, R., P.H. Rodríguez, “Biodisponibilidad de metales y efectos ambientales del cobre en suelos agrícolas”, en: Torres P.J.C. *Cobre, Medioambiente y salud. Aportes de la Ciencia*. Ed. Comisión Chilena del cobre, ISBN 956-8242-04-X, 2005a.
- Ginocchio, R., P.H. Rodríguez, “Incorporación de desechos y productos de la minería del cobre a suelos”, en: Torres, P.J.C. *Cobre, Medio ambiente y salud. Aportes de la Ciencia*. Ed. Comisión Chilena del cobre. ISBN 956-8242-04-X, 2005b.
- González, B.J.L. J.M.J. Carrión, O.Y. Gamboa, L.C. Díaz, “Contaminación de la bahía de Chetumal por metales pesados, materia orgánica y nutrientes producidos por las descargas de aguas residuales municipales”, en *Caos Conciencia*, vol. 1, 5-11, 2008.

- González, E., R., Solano, V., Rubio, A., Leyva, J., Paz-Ares, “Phosphate transporter traffic facilitator is a plant-specific SEC12 related protein that enables the endoplasmic reticulum exit of a high-affinity phosphate transporter in Arabidopsis”, en *Plant Cell*, vol. 17, 3500-3512, 2005.
- González-Mendoza, D., A., Quiroz-Moreno, R.E., Medrano, O., Grimaldo-Juárez, O., Zapata-Pérez, “Cell viability and leakage of electrolytes in *Avicennia germinans* exposed to heavy metals”, en *Z Naturforsch C.*, vol. 64, 391-394, 2009.
- González-Mendoza, D., O., Grimaldo-Juárez, L., Cervantes-Díaz, “Los elementos potencialmente tóxicos en las plantas de manglar: Una revisión de los mecanismos de tolerancia involucrados”, en *Interciencia*, vol. 33, 817-820, 2008.
- González-Mendoza, D., V., Ceja-Moreno, G., Gold-Bouchot, R.M., Escobedo-Gracia, M., Del-Río, D., Valdes-Lozano, O., Zapata-Perez, “The influence of radical architecture on cadmium bioaccumulation in the black mangrove, *Avicennia germinans* L.”, en *Chemosphere*, vol. 67, 330-334, 2007.
- Gravisu, C., J., Hernández-Allica, O., Barrutia, I., Alkorta, J.M., Becerril, “Phytoremediation: a technology using green plants to remove contaminants from polluted areas”, en *Review of Environment Health*, vol. 17, 75-90, 2002.
- Grilli, C.M., C. Forni, “The hard life of prokaryotes in the leaf cavities of *Azolla*”, en J. Seckbach (ed.), *Enigmatic microorganisms and life in extreme environments*, 629-639, 1999.
- Gresits, I., K., Kőnczöl, “Determination of trace elements in *Mycobacterium fortuitum* by x-ray fluorescence spectrometry”, en *X-Ray Spectrometry*, vol. 32, 413-417, 2003.
- Gunes, A., A. Inal, Y. K., Kadloglu, “Determination of mineral element concentrations in wheat, sunflower, chickpea and lentil cultivars in response to P fertilization by polarized energy dispersive X-ray fluorescence”, en *X-Ray Spectrometry*, vol. 38, 451-462, 2009.
- Hoffmann, W.A., H., Poorter, “Avoiding bias in calculations of relative growth rate”, en *Annals of Botany*, vol. 90, 37-42, 2002.
- Hove, V.C., A., Lejeune, “The *Azolla-Anabaena* symbiosis”, en *Biology and Environment: Proc. Roy. Irish Acad.* Vol. 1, 23-26. 2002.
- Huang, J.W., C.Y., Poynton, L.V., Kochian, M.P., Elles, “Phytofiltration of arsenic from drinking water using arsenic-hyperaccumulating ferns”, en *Environmental Science and Technology*, vol. 38, 3412-3417, 2004.
- Huang, Z., L., Li, G., Huang, Q., Yan, B., Shi, X., Xu, “Growth-inhibitory and metal-binding proteins in *Chlorella vulgaris* exposed to cadmium or zinc”, en *Aquatic Toxicology*, vol. 91, 54-61, 2009.
- ICSC (International Civil Service Commission), “Cobre”, Ficha ICSC 0240, Internacional de Sustancias Peligrosas, 1994.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía), “La minería en México” 0187-490X, 2007.
- Iniesta, R., J., Blanco, “Bioacumulación de hidrocarburos y metales asociados a vertidos accidentales en especies de interés comercial de Galicia” en *Galega dos Recursos Mariños* (Monografía), vol. 2, 200 pp., 2005.
- IPCS, Arsenic and arsenic compounds. Ginebra (Suiza), Organización Mundial de la Salud, Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (nº 224 de la serie de la OMS Criterios de Salud Ambiental). 2001.
- Jing, Z., Z., Quan-Zhi, D., Gui-Lan, H., Yan-Chao, “Influence of sulphur on arsenic accumulation and metabolism in rice seedlings”, en *Environmental and Experimental Botany*, doi:10.1016/j.envexpbot.2010.05.007 Key: citeulike: 7241833, 2010.
- Johnston, E., D., Roberts, “Contaminants reduce the richness and evenness of marine communities: A review and meta-analysis”, en *Environmental Pollution*, vol. 157, 1745-1752, 2009.
- Judd, W. S., C. S., Campbell, E. A., Kellogg, P.F. Stevens, M.J. Donoghue, “Plant systematics: a phylogenetic approach”, Second Edition. Sinauer Assoc, USA. 2002.
- Kachenko, A.G. B., Singh, N., Bhatia, “The role of low molecular weight ligands in nickel hyperaccumulation in *Hybanthus floribundus* subspecies *floribundus*”, en *Functional Plant Biology*, vol. 37, 1143-1150, 2010.

- Kamnev, A., M., Colina, J. Rodríguez, “Comparative spectroscopic characterization of different pectins and their source”, en *Food Hydrocolloids*, vol. 12, 263-271, 1998.
- Kannaiyan, S., K. Kumar, “Biodiversity of *Azolla* and its algal symbiont *Anabaena azollae*”, en NBA Scientific Bulletin, National Biodiversity Authority, Chennai, TamilNadu, India, vol. 2, 1-31, 2006.
- Kanoun-Boulé, M., J.A.F., Vicente, “Ecophysiological tolerance of duckweeds exposed to copper”, en *Aquatic Toxicology*, vol. 91, 1-9, 2009.
- Khalil, G.A., I.D. Barcelo-Quintal, V.M., Cetina-Alcalá, B.A., Laure, J., Pérez-Nieto, M.A., Borja-Salin, “Absorción de cobre y características de *Leucaena leucocephala* asociada con *Glomus* spp. y *Rhizobium* en suelo contaminado del Río Lerma, México”, en *Terra Latinoamericana*, vol. 24, 347-354, 2006.
- Khosravi, M., R., Rakhshae, G.M., Taghi, “Pre-treatment processes of *Azolla filiculoides* to remove Pb (II), Cd(II), Ni(II) and Zn(II) from aqueous solution in the batch and fixed-bed reactors”, en *Journal of Hazardous Materials B*, vol. 127, 228-237, 2005.
- Kneip, C., P., Lockhart, C., Voß, U., Maier, “Nitrogen fixation in eukaryotes-New models for symbiosis”, en *BMC Evolutionary Biology*, vol. 7, 55, 1-12, 2007.
- Kirkby, E.A., V., Römheld, “Micronutrient in plant physiology: functions, uptake and mobility”, en Proceeding 543, *The International Fertilizer Society*, P. O. Box, York, YO32 5YS, United Kingdom, 2007.
- Kraus, P., W. Walter, “Toxic metals can be removed from wastewater with *Azolla*, a water fern that grows in the Far East”, en *Environmental Science and Technology*, vol. 21, 1145-1154, 1987.
- Krosravi, M., T.M., Ganji, R., Rakhshae, “Toxic effect of Pb, Cd, Ni and Zn on *Azolla filiculoides* in the international Anzali Wetland”, en *International Journal Environmental Science and Technology*, vol. 2, 35-40, 2005.
- Küpper, H., E., Lombi, F.J., Zhao, S.P., McGrath, “Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*”, en *Planta*, vol. 212, 75–84, 2009.
- Küpper, H., I., Šetlík, M., Spiller, F.C., Küpper, O., Prášil, “Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation”, en *Journal Phycology*, vol. 38, 429-441, 2002.
- Lagos, G. “Exposición humana a cobre en agua potable”, en Torres P.J.C. *Cobre, Medio ambiente y salud. Aportes de la Ciencia*. Ed. Comisión Chilena del cobre. ISBN 956-8242-04-X, 2005.
- Lepp, N.W., “Effect of heavy metals pollution on plants”, en *Effects of trace on plant function. Applied Science Publishers*. London and New Jersey, vol 1. 1981.
- Lesikar, B.J., R.H., Melton, M.F., Hare, J., Hopkins, M.C., Dozier, “Drinking Water problems-Arsenic: Texas Cooperative Extension”. En Texas A&M. L-5467S.pp. 1-8, 2006.
- Letelier M.E., A.M., Lepe, M., Faúndez, J., Salazar, R., Marín, P., Aracena, H., Speisky, “Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity”, en *Chemico-Biological Interactions*, vol. 15, 71-82, 2005.
- Letelier M., L., Sánchez-Jofré, J., Peredo-Silva, P., Cortés-Troncoso, E. Aracena-Parks, “Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein-binding effects”, en *Chemico-Biological Interactions*, vol. 188, 220-227, 2010.
- Lichtenthaler, H.K., “Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes”, en Douce, R., L., Packer (eds.), *Methods of Enzymology*. Academic Press Inc., New York. vol. 148, 350-382, 1987.
- López-Martínez, S., M. López-Martínez, E., Gallegos-Martínez, L.J., Pérez Flores, M., Gutiérrez Rojas, “Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas”, en *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, vol. 21, 91-100, 2005.
- Ma, L.Q., K.M., Komart, C., Tu, W., Zhang, Y., Cai, E.D., Kennelly, “A fern that hyperaccumulates arsenic”, en *Nature*, vol. 409, 579-579, 2001.

- Mackenzie, D.I., C.E., McKenzie, L.W., Brownlie, “Comparison of the helminth fauna of eastern and western kingbirds at Delta Marsh, Manitoba”, en *Canadian Journal of Zoology*, 57, 1143-1149, 1979.
- Mandal B.K., K.T., Suzuki, “Arsenic around the world: a review”, en *Talanta*, 58, 201-235, 2002.
- Marcano, L., I. Carruyo, C., Morales, X., Montiel, P., Moreno, “Evaluación de los cambios ultraestructurales de adaptación de la microalga *Scenedesmus* sp al estrés inducido por cadmio y vanadio (Cd y V)”, en *Acta Microscopica*, vol. 19, 214-220, 2010.
- Martínez-Trujillo, M., G.M., Sántiz, C.R., Ortíz, Y., Carreón-Abud, “Efecto del cobre en el crecimiento y arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L.”, en *Biologicas*, vol. 11, 122-131, 2009.
- Matschullat, J., “Arsenic in the geosphere—a review”, en *Science of the Total Environment*, vol. 249, 297-312, 2000.
- Matthäus, M., “Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds”, en *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, 3444-3452, 2002.
- Mayz-Figueroa, J., “Fijación biológica de nitrógeno”, en *Revista Científica UDO Agrícola*, vol. 4, 1-20, 2004.
- McGrath, S.P., F.J., Zhao, “Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils”, en *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 14, 277-282, 2003.
- Meagher, R.T., C. Vassiliadis, “Phenotypic impacts of repetitive DNA in flowering plants”, en *New Phytologist*, vol. 168, 71-80, 2005.
- Meharg, A.A., “Arsenic and old plants”, en *New Phytologist*, vol. 156, 1-8, 2002.
- Meharg, A.A., “Relationship between plant phosphorus status and the kinetics of arsenate influx in clones of *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv that differ in their tolerance to arsenate”, en *Plant and Soil*, vol. 162, 99-106, 1994.
- Meharg, A.A., “Variation in arsenic accumulation-hyperaccumulation in ferns and their allies”, en *New Phytologist*, vol. 157, 35-31, 2003.
- Meharg, A.A., M.J., Hartley-Witaker, “Arsenic uptake and metabolism in arsenic plant species”, en *New Phytologist*, vol. 154, 29-43, 2002.
- Meharg, A.A., M.R. Macnair, “Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L”, en *Journal Experimental of Botany*, vol. 43, 519-524, 1992.
- Merchant, S.S., “Trace metal utilization in chloroplasts”, en *The structure and function of plastids, Advances in photosynthesis and respiration; Chapter 10*, Wise, R.R., J.K. Hooper, Springer, vol. 23, 200-213, 2007.
- Mesjasz-Przybyłowicz, J., K., Grodzinska, W.J., Przybyłowicz, B., Godzik, G., Szarek-Łukaszewska, “Micro-PIXE studies of elemental distribution in seeds of *Silene vulgaris* from a zinc dump in Olkusz, southern Poland”, en *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, vol. 158, 306-311, 1999.
- Metzgar, J.S., H., Schneider, M.P. Kathleen, “Phylogeny and divergence time estimates for the fern genus *Azolla* (Salviniceae)”, en *International Journal of Plant Science*, vol. 168, 1045-1053, 2007.
- Miki, A., H. Ikeda, K. Itoh, K. Usui, “Effects of five rice herbicide on the growth of two threatened aquatic ferns”, en *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 63, 463-468, 2006.
- Miller, D.S., J.R., Shaw, C.R., Staton, R., K.H., Barnaby-Karlson, J.W., Hamilton, B.A., Staton, “MRP2 and acquired tolerance to inorganic arsenic in the kidney of killifish (*Fundulus heteroclitus*)”, en *Toxicology Science*, 27, 1-41, 2007.
- Mkandawire, M., B. Taubert, E.G.Dudel, “Capacity of *Lemna gibba* L. (duckweed) for uranium and arsenic phytoremediation in mine tailing water”, en *International Journal of Phytoremediation*, vol. 6, 347-362, 2004.
- Mochizuki, M., Mori M., Hondo R., Ueda F., “A new index for evaluation of cadmium pollution in birds and mammals”, en *Environmental Monitoring Assessment*, vol. 131, 323-327, 2007.

- Mondal, P., C.B., Majumder, B., Mohanty, “Laboratory based approaches for arsenic remediation from contaminated water: Recent developments”, en *Journal of Hazardous Materials*, vol. 137,464-479, 2006.
- Mordechai, S., J. Garty, E. Tel-Or, “The accumulation and the effect of heavy metals on the water fern *Azolla filiculoides*”, en *New Phytologist*, vol. 112, 7-12, 1989.
- Morteza, K., R. Rakhshae, G.M. Taghi, “Pre-treatment processes of *Azolla filiculoides* to remove Pb(II), Cd(II), Ni(II) and Zn(II) from aqueous solution in the batch and fixed-bed reactors”, en *Journal of Hazardous Materials*, vol. 127, 228-237, 2005.
- Mosquera, L.J., R.A. Calderón, “Evaluación de parámetros bioquímicos y morfogenéticos en la simbiosis *Azolla filiculoides*-*Anabaena azollae* como respuesta a la interacción de la calidad de luz y dos niveles de nitrógeno”, en *Ecología aplicada*, vol.1, 89-94, 2002.
- Navarro, A.E., D. Blanco, B. Llanos, J. Flores, H. Maldonado, “Bioremediación de Cadmio (II) por desechos de algas marinas. Optimización del Equilibrio y Propuesta de Mecanismo”, en *Revista de la Sociedad de Química de Perú*, vol. 70, 147-157, 2004.
- Navarro, A.J.P., A.I. Aguilar, J.R. López-Moya “Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas”, *Ecosistemas*, vol. 2, 1-17, 2007.
- Navas, M., R., Gutiérrez, E., Bisbal, “Evaluation of several types of native *Azolla* in Venezuelan soils with vocation of use for rice cultivation”, en *Revista de la Facultad de Agronomía*, vol. 13, 13-21, 2006.
- Nemerow, N., A. Dasgupta, “Tratamiento de vertidos industriales y peligrosos”, en Díaz de Santos (Ed), ISBN 8479783370, 842 pp., 1998.
- Nickrent, D., C.L., Parkinson, J.D., Palmer, R.J., Duff, “Multigene phylogeny of land plants with special reference to bryophytes and the earliest land plants”, en *Molecular Biology and Evolution*, vol. 17, 1885-1895, 2000.
- Nicolaus, B., A., Panico, L., Lama, I., Romano, M., Cristina, A., DeGiulio, A., Gambacorta, “Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyano-bacteria”, en *Phytochemistry*, vol. 52, 639-647, 1999.
- NOM-127-SSA1-1994. Modificación a la Norma Oficial Mexicana Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización agua para uso y consumo humano. *Diario Oficial de la Federación*. 2000.
- Olgún, E.J., G. Sánchez-Galván, T. Pérez-Pérez, A. Pérez-Orozco, “Surface adsorption, intracellular accumulation and compartmentalization of Pb(II) in batch operated lagoons with *Salvinia minima* as affected by environmental conditions, EDTA and nutrients”, en *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 32, 577-586, 2005.
- Olgún, J.E., M.E. Hernández, G. Sánchez-Galván, “Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración”, en *Revista Internacional de Contaminación*, vol. 23, 139-154, 2007.
- OMS (Organización Mundial de la Salud), “Valores de referencia de sustancias químicas cuya presencia en el agua de bebida es significativa para la salud”, en Guías para la calidad del agua potable. 3ª Edición, vol. 1., ISBN 92-4-154638-7, 2004.
- OMS (Organización Mundial de la Salud), “Arsenic in drinking-water”, en Documento de referencia para la elaboración de las Guías de la OMS para la calidad del agua potable. Ginebra (Suiza), Organización Mundial de la Salud (WHO/SDE/WSH/03.04/75), 2003.
- Onundi, Y.B., A.A., Mamun, M.F.A. Khatib, Y.M. Ahmed, “Adsorption of copper, nickel and lead ions from synthetic semiconductor industrial wastewater by palm shell activated carbon”, en *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 7, 751-758, 2010.
- Öpik, H., S. Rolfe “The physiology of flowering plants”, en Cambridge University Press. Cambridge, UK. 362 pp, 2005.
- Oren-Benaroya, R., V., Tzin, E, Tel-Or, E., Zamski, “Lead accumulation in the aquatic fern *Azolla filiculoides*”, en *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 42, 639-45, 2004.
- Ortega, F., “Helechos acuáticos de Venezuela”, en *Sociedad de Ciencias Naturales, La Salle*, 5-8, 1980.

- Ortiz-Castro, R., M., Martínez-Trujillo, J., López-Bucio, C. Cervantes, “Effects of dichromate on growth and root system architecture of *Arabidopsis thaliana* seedlings”, en *Plant Science* vol. 172, 684-691, 2007.
- Ortiz-Catón, A., L.R., Quintero, R., Ferrera-Cerrato, “Efecto de metales pesados en el simbiosistema *Azolla Anabaena*”, en *Terra* 12, 317-322, 1992.
- Padmavathiamma, P.K., L.Y., Li, “Phytoremediation Technology: Hyper-accumulation Metals in Plants”, en *Water Air Soil Pollution*, vol. 184, 105–126. 2007.
- Pádua, M., A.M., Cavaco, S., Aubert, R., Bigny, A., Casimiro, “Effects of copper on the photosynthesis of intact chloroplasts: interaction with manganese”, en *Physiology Plant*, vol. 138, 301-11, 2010.
- Pankit, A.N., S.A., Bhawe, “Cooper metabolic defects and liver disease: Environmental aspects”, en *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 17, 3, 403-407, 2002.
- Perales-Vela, H.V., S., González-Moreno, C., Montes-Horeasitas, R.O., Cañizares-Villanueva, “Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae)”, en *Chemosphere*, vol. 67, 2274-2281, 2007.
- Pereira, A.L., F., Carrapico, “Culture of *Azolla filiculoides* in artificial conditions”, en *Plant Biosystems*, vol. 143, 431-434, 2009.
- Perera, P., B. Baudot, “Guia procesos extensivos de depuración de las aguas residuales. Adaptadas a las pequeñas y medias colectividades”, ISBN 92-894-1690-4, Francia, 44 pp., 2001.
- Pilon-Smits, E., “Phytoremediation”, en *Annual Review of Plant Biology*, vol. 56, 15-39, 2005.
- Pittman, J.K. “Mechanisms of manganese accumulation and transport”, en *Plant membrane and vacuolar transporter*, Jawai, P.K., R.P. Singh, O.P. Dhankher, 173-204, 2007.
- Quintero, L.R., “El sistema simbiótico fijador de nitrógeno *Azolla-Anabaena*”, en Ferrera-Cerrato, R., J. Pérez (Ed.), *Agromicrobiología elemento útil en la agricultura sostenible*, Colegio de Postgraduados, México, 127-147, 1995.
- Quintero, L.R., R. Ferrera-Cerrato, “*Azolla* helecho fijador de nitrógeno y su potencial en México”, en J. J. Peña Cabriaes (Ed.), *La fijación biológica de nitrógeno en América Latina: El aporte de las técnicas isotópicas*, Irapuato, México, 2000.
- Quintero, L.R., R. Ferrera-Cerrato, “*Azollatum* “Alfredo Echeagaray Alemán”, en Tovar, J.L., R.L., Quintero (Eds.). *La investigación edafológica en México. Memorias del XXV Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo*, 242 pp., 1992.
- Rahman, M., “Arsenic and contamination of drinking-water in Bangladesh: a public-health perspective”, en *Journal of Health Population and Nutrition*, vol. 20, 193-197, 2002.
- Rahman, M.A., H. Hasegawa, K. Ueda, T. Maki, C. Okumura, M.M. Rahman, “Arsenic accumulation in duckweed (*Spirodela polyrhiza* L.): a good option for phytoremediation”, en *Chemosphere*, vol. 69, 493-499, 2007.
- Rahman, M.A., H., Hasegawa, “Aquatic arsenic: Phytoremediation using floating macrophytes”, en *Chemosphere*, vol. 83, 633-46, 2011.
- Rai, P.K., B.D., Tripathi, “Comparative assessment of *Azolla pinnata* and *Vallisneria spiralis* in Hg removal from G.B. Pant Sagar of Singrauli Industrial region, India”, en *Environment Minit Assess*, vol. 148, 75-84, 2009.
- Rakhshae, R., M., Khosravi, M.T., Ganji, “Kinetic modeling and thermodynamic study to remove Pb(II), Cd(II), Ni(II) and Zn(II) from aqueous solution using dead and living *Azolla filiculoides*”, en *Journal of Hazardous Materials*, vol. 134, 120-129, 2006.
- Ran, L., J., Larsson, T., Vigil-Stenman, J.A.A., Nylander, K., Ininbergs, Z., Wei-Wen, A., Lapidus, S. Lowry, R., Haselkorn, B., Bergman, “Genome erosion in a nitrogen-fixing vertically transmitted endosymbiotic multicellular cyanobacterium”, en *PLoS ONE*, vol. 5, 1-11, 2010.
- Rauf, A., M., Javed, M., Ubaidullah, S., Abdullah, “Assessment of heavy metals in sediments of the river Ravi, Pakistan”, en *International Journal of Agricultural Biological*, vol. 11, 197–200, 2009.
- Rausser, W.E. “Phytochelatin and related peptides”, en *Plant Physiologist*, vol. 109, 1141-1149, 1995.
- Reeves, M., K. Schafer, K. Hallward, A. Katten, “Campos Envenenados: Los trabajadores agrícolas y los pesticidas en California. Pesticide Action Network North America www.panna.org, 2000.

- Reid, J.D., G.M., Plunkett, G.A., Peters, "Phylogenetic Relationships in the Heterosporous Fern Genus *Azolla* (Azollaceae) Based on DNA Sequence Data from Three Non-coding Regions", en *International Journal of Plant Science*, vol. 167, 529-538, 2006.
- Reid, J.D., G.M. Plunkett, G.A. Peters, "Direct submission", en JOURNAL Submitted (17-MAY-2005) Dept. of Biology, Virginia Commonwealth University, PO Box 842012, Richmond, VA 23284, USA.
- Renzaglia, K.S., R.J., Duff, D.L. Nickrent, D.J. Garbary, "Vegetative and reproductive innovations of early land plants; implications for a unified phylogeny", en *Philosophical Transactions Royal Society London B*, vol. 355, 769-793, 2000.
- Reynolds, A.K., "Tratamiento de aguas residuales en Latinoamérica. Identificación del problema", en *Agua Latinoamérica de la llave*, vol.1, 1-4, 2002.
- Rodríguez, M.P., J., Plascencia, R.M., Gavilanes, "Relación entre la actividad de la NADPH oxidasa compuestos esfíngoides y respuesta a patógenos en células vegetales", en *Memorias del XIV Congreso de bioenergética y biomembranas*, vol. 1, 1-9, 2005.
- Romero, Y., C., Lodeiros, M., Esclapés, N., Marín, M., Guevara, E., Morales, "Efecto tóxico del cadmio sobre microalgas aisladas del nororiente de Venezuela", en *Interciencia*, vol. 27, 104-109, 2002.
- Rousseau, R.M., J.P., Willis, A.R., Duncan, "Practical XRF calibration procedures for major and trace elements", en *X-Ray spectrometry*, vol. 25, 179-189, 1996.
- Rudra, D.T., S., Sudhakar, M., Seema, S., Nandita, T., Rakesh, K.G., Dharmendra, J.M.M., Frans, "Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants", en *Trends Biotechnology*, vol. 25, 159-165, 2006.
- Ruvalcaba-Sil, J.L., R.H., Miranda, M.V., Aguilar, N.F., Picazo, "SANDRA: A portable XRF system for the study of mexican cultural heritage", en *X-Ray Spectrometry*, vol. 39, 338-345, 2010.
- Sakihama, Y., M.F., Cohen, C.S., Grace, H., Yamasaki, "Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induces oxidative damage mediated by metals in plants", en *Toxicology*, vol. 177, 67-80, 2002.
- Salt, D.E., M. Blaylock, N. Kumar, V. Duchonkov, B.D. Ensley, I. Che, I. Raskin, "Phytoremediation: A novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants", en *Biotechnology*, vol. 13, 468-474, 1995.
- Salt, D.E., R.D., Smith, I., Raskin, "Phytoremediation", en *Annual Review of Plant Physiology*, vol. 49, 643-661, 1998.
- Sancenon, V., S., Puig, H., Mira, D.J. Thiele, L. Penarrubia, "Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*", en *Plant Molecular Biology*, vol. 51, 577-587, 2003.
- Sanderson, M.J., "Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: a penalized likelihood approach", en *Molecular Biology and Evolution*, vol. 19, 101-109, 2002.
- SAS, "The SAS system for windows", ver. 9.0.SAS Institute Inc, Cary, North Carolina, 2002.
- Sato, K., T., Kohzuma, C., Dennison, "Active site structure and electron-transfer reactivity of plastocyanins", en *Journal American Chemistry Society*, 2101-2112, 2003.
- Scheckhuber, C., J., Grief, E., Boilan, K., Luce, F., Debacq-Chainiaux, C. Rittmeyer, R., Gredilla, B.O., Kolbesen, O., Toussaint, H.D., Osiewacz, "Age-related cellular copper dynamics in the Fungal ageing model *Posospora anserine* and in ageing human fibroblasts", en *Plos One*, vol. 4, 1-14, 2009.
- Schneider, H., K.M. Pryer, R. Cranfill, A.R. Smith, P.G. Wolf. "Evolution of vascular plant body plans: a phylogenetic perspective", en Conk, Bateman, Hawkins (ed): *Developmental Genetics and Plant Evolution*. Taylor & Francis, Londres, 330-364, 2002.
- Schor-Fumbarov, T., P.B., Goldsbrough, Z., Adam, E., Tel-Or, "Characterization and expression of a metaoathionein gene in the aquatic fern *Azolla filiculoides* under heavy metal stress", en *Planta*, vol. 223, 69-76, 2005.
- Sekabira, K., H., Oryem-Origa, G., Mutumba, E., Kakudidi, T.A., Basamba, "Heavy metal phytoremediation by *Commelina benghalensis* (L) and *Cynodon dactylon* (L) growing in urban

- stream sediments”, en *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 38, 133-142, 2011.
- Sela, M., E., Tel-Or, E., Fritz, A., Huttermann, “Localization and toxic effects of cadmium, copper, and uranium in *Azolla*”, en *Plant Physiologist*, vol. 88, 30-36, 1990.
- Sela, M., J. Garty, E. Tel-Or, “The accumulation and the effect of heavy metals on the water fern *Azolla filiculoides*”, en *New Phytologist*, vol. 112, 7-12, 1989.
- Sela, M., E., Fritz, A., Huttermann, E., Tel-Or, “Studies on cadmium localization in the water fern *Azolla*”, en *Physiology Plant*, vol. 79, 547-553, 2005.
- Schor-Fumbarov, T., B., Peter, Z.A., Goldsbrough, A., Zach, A., Tel-Or, “Characterization and expression of a metallothionein gene in the aquatic fern *Azolla filiculoides* under heavy metal stress”, en *Planta*, vol. 223, 69-76, 2005.
- SEMARNAT (Secretaría de Marina y Recursos Naturales), “<http://www.semarnat.gob.mx>” Consultada en abril, 2008.
- Sheng-Gen, H., J., Daryl, W. Ming-Zu, “Characterization of polyamine oxidase from the aquatic nitrogen-fixing fern *Azolla imbricate*”, en *Plant Science*, vol. 169, 185-190, 2005.
- Shi, J.Y., X., Yuan, X.Y., Chen, B., Wu, Y.Y., Huang, Y., Chen, “Copper Uptake and its effect on metal distribution in root growth zones of *Commelina communis* revealed by SRXRF”, en *Biological Trace Element Research*, ISBN 1559-0720, 2010.
- Shiny, K.J., K.N., Remani, T.K. Jalaja, V.K. Sasidharan, “Removal of chromium by two aquatic pteridophytes”, en *Journal Environment Science and Engineer*, 46, 249-252, 2004.
- Shiomi, N., S. Kitoh, “The growth, nitrogen fixation and nutrient removal capacity of *Azolla* in polluted water”, en *Lakes and Reservoirs: Research and Management*, vol. 2, 175-179.1996.
- Shumilin, E.N., G., Rodríguez-Figueroa, O.B., Morton, E.B., Lounejeva, E., Hernández, G.D.M., Rodríguez, “Anomalous trace elements composition of coastal sediments near the copper mining district of Santa Rosalía, Peninsula of Baja California, México”, en *Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 65, 261-268, 2000.
- Singh, N., L.Q. Ma, M., Srivastava, B., Rathinasabapathi, “Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L”, en *Plant Science*, vol. 170, 274-282, 2006.
- Singleton, V.L., J.A., Rossi, “Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents”, en *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 16, 144-147, 1965.
- Sivaci, A., E., Elmas, F., Gümüs, “Removal of Cadmium by *Myriophyllum heterophyllum* Michx and *Potamogeton crispus* L. and Its Effect on Pigments and Total Phenolic Compounds”, en *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 54, 612-618, 2008.
- Smadar, E., B., Chefetz, E. Tel-Or, L. Vidal, A. Canals, A. Gedanken, “Removal of silver and lead ions from water wastes using *Azolla filiculoides*, an aquatic plant, which adsorbs and reduces the ions into the corresponding metallic nanoparticles under microwave radiation in 5 min”, en *Water Air Soil Pollution*, vol. 218, 218-365, 2011.
- Smedley, P.L., D.G., Kinniburgh, “A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters”, en *Applied Geochemistry*, 17, 517-568, 2002.
- Smith, A.R., K.M., Pryer, E., Schuettpelz, P., Korall, H., Schneider, R., Cranfill, “A classification for extant ferns”, en *Taxon PG Wolf*, vol.55, 705-731, 2006.
- Smith, E., R., Naidu, A.M., Alston, “Chemistry of inorganic arsenic in soils: II. Effect of phosphorus, sodium and calcium on arsenic sorption”, en *Journal Environment and Quality*, vol. 31, 557-563, 2002.
- Smith, W.F., “Fundamentos de la Ciencia e Ingeniería de Materiales”, Madrid, Ed. Mc Graw Hill. ISBN 84-481-1429-9, 1998.
- Soong, Y.Y., P.J., Barlow, “Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds”, en *Food Chemistry*, vol.88, 411-417, 2004.
- Stepniewska, Z., R.P., Bennicelli, T.I., Balakhnina, K. Szajnocha, A., Banach, A., Wolinska, “Potential of *Azolla caroliniana* for the removal of Pb and Cd from wastewaters”, en *International Agrophysics*, vol. 19, 251-255, 2005.

- Strasser, B.J., R.J., Strasser, “Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test” en Mathis, P. (Ed.), *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 977-980, 1995.
- Sunda, W.G., G.A.M., Lewis, “Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular algae, *Monochrysis lutheri*”, en *Limnology and Oceanography*, vol. 23, 870-876, 1978.
- Synytsya, A., J., Copikova, P., Matejka, V., Mackovic, “Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins”, en *Carbohydrate Polymers*, vol. 54, 97-106, 2003.
- Taghi, M., M. Khosravi, R. Rakhshae, “Biosorption of Pb (II), Cd (II), Cu (II) and Zn (II) from the wastewater by treated *Azolla filiculoides* with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/MgCl<sub>2</sub>”, en *Journal Environmental Science and Technology*, vol. 1, 265-271, 2005.
- Tamas, L., S., Budikova, M., Simonovicova, J., Huttova, B., Siroka, I., Mistrik, “Rapid and simple method for Al-toxicity analysis in emerging barley roots during germination”, en *Biologia Plantarum*, vol. 50, 87-93, 2006.
- Teixeira, G., F., Carrapico, E.T., Gomes, “C-glycosylflavones in the genus *Azolla*”, en *Plant Biosystems*, vol. 135, 233-237, 2001.
- Tsutsumimoto, K., K., Tsuji, “Time-resolved x-ray fluorescence for monitoring the intake of mineral nutrients in living plants”, en *X-Ray Spectrometry*, vol. 36, 324-327, 2007.
- Tu, C., L.Q., Ma, “Effects of arsenic concentrations and forms on arsenic uptake by the hyperaccumulator Ladder Brake”, en *Journal of Environmental Quality*, vol. 31, 641-647, 2002.
- Tu, C., L.Q., Ma, W., Zhang, Y., Cai, W.G., Harris, “Arsenic species and leachability in the fronds of the hyperaccumulator Chinese brake (*Pteris vittata* L.)”, en *Environmental Pollution*, vol. 124, 223-230, 2003.
- Tyystjärvi, E., Photoinhibition of Photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster *Coord*”, en *Chemical Reviews*, vol. 252, 361-376, 2008.
- Ullrich-Eberius, C.I., A., Sanz, J., Novacky, “Evaluation of arsenate- and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* G1.”, en *Journal of Experimental Botany*, vol. 40, 119-128, 1989.
- Upadhyay, A.R., V.K. Mishra, S.K. Pandey, B.D. Tripathi, “Biofiltration of secondary treated municipal wastewater in a tropical city”, en *Ecological Engineering*, vol. 30, 9-15, 2007.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), “Estándares del Reglamento Nacional para Agua Potable de los Estados Unidos”, *Agua Latinoamérica*, vol. 1, 2001.
- Van-Hove, C., “*Azolla* and its multiple uses with emphasis on Africa”, en *Food and Agriculture Organization*, Rome Italy. 53 p, 1989.
- Van-Hove, C., A., Lejeune, “The *Azolla*–*Anabaena* symbiosis”, en *Biology and Environment, Proceedings of the Royal Irish Academy* 102B, vol. 1, 23-26, 2002.
- Van-Hove, C., “Taxonomy of the American *Azolla* species (Azollaceae): A critical review”, en *Systematics and geography of plants*, vol. 74, 301-318, 2004.
- Vásquez, C., N., Bárbaro, S., López, “XRF analysis of micronutrients in endive grown on soils with sewage sludge”, en *X-Ray Spectrometry*, vol. 32, 57-59, 2003.
- Vekemans, B., K., Janssens, L., Vincze, F., Adams, P., Van Espen, “Analysis of X-ray spectra by iterative least squares (AXIL): New developments”, en *X-ray Spectrometry*, vol. 23, 278-285, 1994.
- Ventura, A.C., L., Bruno, D., Ponce, S. “Simple data-driven models of intracellular calcium dynamics with predictive power”, en *Physical Review E*, vol. 74, 1-11, 2006.
- Vetterlein, D., D., Wesenberg, P., Nathan, A., Bräutigam, A., Schierhorn, J., Mattusch, R., Jahn, “*Pteris vittata*–Revisited: Uptake of As and its speciation, impact of P, role of phytochelatins and S.”, en *Environmental Pollution*, vol. 157, 3016-3024, 2009.
- Villa-Bellostá, R., H., Giral, A., Ferrer-Dufol, V., Sorribas, “Role of phosphate transporters in the membrane transport of arsenate”, en *Toxicology Letters*, vol. 164, 150, 2006.
- Villanueva, S.F., A.V., Botello, “Metal pollution in coastal areas of Mexico”, en *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology*, vol. 157, 53-94, 1998.

- Villar, R., J., Ruiz-Robledo, J.L. Quero, H., Poorter, F., Valladares, T., Marañón, “Tasa de crecimiento en especies leñosas: aspectos funcionales e implicaciones ecológicas”, en Valladares, F. “*Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*”, Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, S.A. Madrid, ISBN 84-8014-552-8, vol. 1, 191-227, 2004.
- Virender, K.S., M., Sohn, “Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation”, en *Environment International*, vol. 35, 743-759, 2009.
- Volesky, B., “Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century”, en *Hydrometallurgy*, vol. 59, 203-216, 2001.
- Volke, S.T., T.J.A. Velasco, “Suelos contaminados por metales y metaloides: Muestreo y alternativas para su remediación”, en *INE-SEMARNAT*. ISBN 968-817-492-0, 144 pp., 2005.
- Vullo, D., H., Ceretti, S., Ramírez, A., Zalts “Retención de metales en gel de alginato de calcio”, VI Reunión Anual de SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) Latinoamérica, 20 al 23 octubre, Buenos Aires, Argentina, 2003.
- Xu, X.Y., S.P., McGrath, F.J., Zhao, “Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots”, en *New Phytologist*, vol. 176, 590-599, 2007.
- Yokoyama, J., S, Nakai, “Direct Submission”, en JOURNAL Submitted (14-MAY-2010) Contact: Jun Yokoyama Yamagata University, Department of Biology, Faculty of Science; Kojirakawa 1-4-12, Yamagata, Yamagata 990-8560, Japan
- Yokoyama, J., S., Nakai, T., Shimada, “Plants of genus *Azolla* (Azollaceae) newly recorded from Lake Izunuma”, en JOURNAL: Izunuma-Uchinuma Wetland Res. 4 (2010) *In press*.
- Yoshida, S., D., Forno, J., Cock, K., Gomez, “Laboratory manual for physiological studies of rice”, en *Manila Philippines: International Rice Research Institute*, Third edition, 1971.
- Yuh-Shan, H., “Removal of copper ions from aqueous solution by tree fern”, en *Water Research*, vol. 37, 2323-2330, 2003.
- Yúnez, N.A., G.L.C. Rojas, “Perspectivas de la agricultura mexicana ante reducciones en la disponibilidad de agua para irrigación un enfoque de equilibrio general”, en Guerrero, H., G. Rojas, N. Yúnez, J. Medellín-Azuara (Ed.), *El agua en México: Implicaciones de las políticas de intervención en el sector, México*. FCB. Secretaria de Relaciones Exteriores, 1- 18, 2007.
- Zaki, S., S. Farag, “Isolation and molecular characterization of some copper biosorped strains”, en *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 7, 553-560, 2010.
- Zayed, A., S., Gowthaman, N., Terry, “Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: Duckweed”, en *Journal of Environmental and Quality*, vol. 27, 715-721. 1998.
- Zhang, W., C., Yong, C., Tu, L.Q., Ma, “Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant”, en *The Science of the Total Environment*, vol. 300, 167-177, 2002.
- Zhang, X., L., Ai-Jun, Z., Fang-Jie, X., Guo-Zhong, D., Gui-Lan, Z. Yong-Guan, “Arsenic accumulation by the aquatic fern *Azolla*: Comparison of arsenate uptake, speciation and efflux by *A. caroliniana* and *A. filiculoides*”, en *Environmental Pollution*, vol. 156, 1149-1155, 2008.
- Zhang, X.J., X., Hongyan, E., Helen, S., Olubukola, C., Helen, B.W., Sándor-Frederik, Q., Hua-Ji, L., Lihong, “Evaluation of a primer-probe energy transfer real-time PCR assay for detection of classical swine fever virus”, en *Journal of Virological Methods*, vol. 168, 259-261, 2010.
- Zhao, F.J., S.J., Dunham, S.P., McGrath, “Arsenic hyperaccumulation by different ferns species”, en *New Phytologist*, vol. 156, 27- 31, 2002.
- Zhao, F.J., S.J., Dunham, S.P., McGrath, “Rapid report Arsenic hyperaccumulation by different fern species”, en *New Phytologist*, vol. 156, 27-31, 2002a.
- Zimmerman, W.J., R., Quintero-Lizaola, R., Ferrera-Cerrato, “The genetic identification of species of agronomic *Azolla* Lam. indigenous to Mexico”, en *American Fern Journal*, vol. 83, 97-104, 1993.
- Zimmerman, W.J., T.A .Lumpkin, I., Watanabe, “Classification of *Azolla* spp., section *Azolla*”, en *Euphytica*, vol. 42, 163-170, 1989.

**ANEXO I.** Solución nutritiva de Yoshida (Yoshida *et al.*, 1971).

Macronutrientos*	mM	g 1000 mL <sup>-1</sup>	Micronutrientos**	μM	g 100 mL <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.43		FeCl <sub>3</sub>	35.6	7.70
CaCl <sub>2</sub>	1.00	88.60	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	9.5	1.5
MgSO <sub>4</sub>	1.64	324.0	CuSO <sub>4</sub>	2.0	0.031
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.32	71.40	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0.075	0.074
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.32	40.30	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.9	0.934
Ácido Cítrico		11.90	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O		0.035

\*Se emplean 6.25 mL de c/u por cada 5 L

\*\*Aforar todas las soluciones a 1 L con ácido sulfúrico

**ANEXO II.** Alineamiento de las secuencias de la amplificación del ADN genómico de diez colectas del simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae*.

**CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment**

SINALOA GAATTCAGATTGGAAGTAAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT 60  
 TABASCO GAATTCAGATTGGAAGTAAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT 60  
 TLAHUAC GAATTCAGATTGGAAGTAAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT 60  
 JUITEPEC GAATTCAGATTGGAAGTAAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT 60  
 HND2 GAATTCAGATTGGAAGTAAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT 60  
 COYOTE GAATTCAGATTGGAAGTAAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGACCTGCGGAAGGAT 60  
 CGE GAATTCAGATTGGAAGTAAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT 60  
 TECATE GAATTCAGATTGGAAGTAAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT 60  
 ENSENADA -----  
 TEXMELUCAN GAATTCAGATTGGAAGTAAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT 60  
 XALAPA GAATTCAGATTGGAAGTAAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT 60

SINALOA CATTGACACACATCCAAACAAACAACGCGAACCGTGCTTGTATTTTGAGGCGACGCGCTC 120  
 TABASCO CATTGACACACATCCAAACAAACAACGCGAACCTTGCTTGTATTTTGAGGCGACGCGCTC 120  
 TLAHUAC CATTGACACACATCCAAACAAACAACGCGAACCTTGCTTGTATTTTGAGGCGACGCGCTC 120  
 JUITEPEC CATTGACACACATCCAAACAAACAACGCGAACCGTGCTTGTATTTTGAGGCGACGCGCTC 120  
 HND2 CATTGACACACATCCAAACAAACAACGCGAACCGTGCTTGTATTTTGAGGCGACGCGCTC 120  
 COYOTE CATTGACACACATCCAAACAAACAACGCGAACCTTGCTTGTATTTTGAGGCGACGCGCTC 120  
 CGE CATTGACACACATCCAAACAAACAACGCGAACCTTGCTTGTATTTTGAGGCGACGCGCTC 120  
 TECATE CATTGACACACATCCAAACAAACAACGCGAACCTTGCTTGTATTTTGAGGCGACGCGCTC 120  
 ENSENADA -----CCAAACAAACCACGCGAACCGTGCTTGTATTTTGAGGCGACGCGCTC 47  
 TEXMELUCAN CATTGACACACATCCAAACAAACAACGCGAACCGTGCTTGTATTTTGAGGCGACGCGCTC 120  
 XALAPA CATTGACACACATCCAAACAAACAACGCGAACCGTGCTTGTATTTTGAGGCGACGCGCTC 120

\*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \*

SINALOA GGAGGCGTGTCGCCCTGCTTGACTCCTGTGCTAGATCCGGGGCACGTCGTGGGTCATGT 180  
 TABASCO GGAGGCGTGTCGCCCGCTTGACTCCTGTGCTAGATCCGGGGCACGTCGTGGGTCAGGT 180  
 TLAHUAC GGAGGCGTGTCGCCCGCTTGACTCCTGTGCTAGATCCGGGGCACGTCGTGGGTCATGT 180  
 JUITEPEC GGAGGCGTGTCGCCCGCTTGACTCCTGTGCTAGATCCGGGGCACGTCGTGGGTCATGT 180  
 HND2 GGAGGCGTGTCGCCCGCTTGACTCCTGTGCTAGATCCGGGGCACGTCGTGGGTCATGT 180  
 COYOTE GGAGGCGTGTCGCCCGCTTGACTCCTGTGCTAGATCCGGGGCACGTCGTGGGTCATGT 180  
 CGE GGAGGCGTGTCGCCCGCTTGACTCCTGTGCTAGATCCGGGGCACGTCGTGGGTCATGT 180  
 TECATE GGAGGCGTGTCGCCCGCTTGACTCCTGTGCTAGATCCGGGGCACGTCGTGGGTCAGGT 180  
 ENSENADA GGAGGCGTGTCGCCCGCTGCTGACTCCTGTGCTAGATCCGGGGCACGTCGTGGGTCGTGT 107  
 TEXMELUCAN GGAGGCGTGTCGCCCGCTTGACTCCTGTGCTAGATCCGGGGCACGTCGTGGGTCGTGT 180  
 XALAPA GGAGGCGTGTCGCCCGCTCAACTCCTGTGCTAGATGGGGGGCTCGTCTGTGGTCTTGT 180  
 \*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \*

SINALOA ATGGGTTGTAGGGGTTGTCCCACCGAGAGTGCATATGTACGATGATAGGGACGCCTGTC 240  
 TABASCO GTGGGTTGTAGGGGTTGTCCCACCGAGAGTGCATATGTATGATGACAGGGACGCCTGTC 240  
 TLAHUAC GTGGGTTGTAGGGGTTGTCCCACCGAGAGTGCATATGTATGATGACAGGGACGCCTGTC 240  
 JUITEPEC NTGGGTTGTAGGGGTTGTCCCACCGAGAGTGCATATGTATGATGACAGGGACGCCTGTC 240  
 HND2 GTGGGTTGTAGGGGTTGTCCCACCGAGAGTGCATATGTATGATGACAGGGACGCCTGTC 240  
 COYOTE GTGGGTTGTAGGGGTTGTCCCACCGAGAGTGCATATGTATGATGACAGGGACGCCTGTC 240  
 CGE GTGGGTTGTAGGGGTTGTCCCACCGAGAGTGCATATGTATGATGACAGGGACGCCTGTC 240  
 TECATE GTGGGTTGTAGGGGTTGTCCCACCGAGAGTGCATATGCATGATGAGAGGGACGCCTCTC 167  
 ENSENADA GCGGGTTGTAGGGGTTGTCCCACCGAGAGTGCATATGCATGATGAGAGGGACGCCTCTC 167  
 TEXMELUCAN GTGGGTTGTAGGGGTTGTCCCACCGAGAGTGCATATGCATGATGAGAGGGACGCCTGTC 240  
 XALAPA GTGGGTTGTAGGGGTTGTCCCACCGAGAGTGCATATGCATGATGAGAGGGACGCCTGTC 240  
 \*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \*

SINALOA TTTGTGCGCATCGTGCGGTCGACCCCTCCTTCGTGTCGTATCGGCACGGGGCCGCTAT 300  
 TABASCO TTTGTGCGCATCGTGCGGTCGACCCCTCCTCCGTGTCGTATCGGCACGGGGCCGCTAT 300  
 TLAHUAC TTTGTGCGCATCGTGCGGTCGACCCCTCCTTCGTGCCGTATCGGCACGGGGCCGCTAT 300  
 JUITEPEC TTTGTGCGCATCGTGCGGTCGACCCCTCCTCCGTGCCGTATCGGCACGGGGCCGCTAT 300  
 HND2 TTTGTGCGCATCGTGCGGTCGACCCCTCCTCCGTGCCGTATCGGCACGGGGCCGCTAT 300  
 COYOTE TTTGTGCGCATCGTGCGGTCGACCCCTCCTCCGTATCGGCACGGGGCCGCTAT 300  
 CGE TTTGTGCGCATCGTGCGGTCGACCCCTCCTCCGTGCCGTATCGGCACGGGGCCGCTAT 300  
 TECATE TTTGTGCGCATCGTGCGGTCGACCCCTCCTCCGTGTCGTATCGGCACGGGGCCGCTAT 300  
 ENSENADA ATTTGCGGATCGTGCGGTCGACCCCTCCTCCGTGTTGTACTGGACGGGGCCGCTAT 227  
 TEXMELUCAN TTTGTGCGCATCGTGCGGTCGACCCCTCCTCCGTGTTGTACTGGACGGGGCCGCTAT 300  
 XALAPA ATTTGCGGATCGTGCGGTCGACCCCTCCTCCATGTCATACTGGACGGGGCCGCTAT 300  
 \*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \*

SINALOA GTCAAACCATCTCTTGCCCCTCCTAACCCCTC-TCGTGGGGTAAGGGAGGGAGCGGGAGG 359  
TABASCO GTCAAACCATCTCTTGCCCCTCCTAACCCCTC-TCGTGGGGTAAGGGAGGGAGCGGGAGG 359  
TLAHUAC GTCAAACCATCTCTTGCCCCTCCTAACCCCTC-TCGTGGGGTAAGG-AGGGAACGGGAGG 358  
JIUTEPEC GTCAAACCATCTCTTTCCCTCCTAACCCCTC-TCGTGGGGTAAGG-AGGGAACGGGAGG 358  
HND2 GTCAAACCATCTCTTTCCCTCCTAACCCCTC-TCGTGGGGTAAGG-AGGGAACGGGAGG 358  
COYOTE GTCAAACCATCTCTTTCCCTCCTAACCCCTC-TCGTGGGGTAAGG-AGGGAACGGGAGG 358  
CGE GTCAAACCATCTCTTTCCCTCCTAACCCCTC-TCGTGGGGTAAGG-AGGGAACGGGAGG 358  
TECATE GTCAAACCATCTCTTGCCCCTCCTAACCCCTC-TCGTGGGGTAAGG-AGGGAACGGGAGG 286  
ENSENADA GTCAAACCATCTCTTGCCCCTCCTAACCCCTC-TCGTGGGGTAAGG-AGGGAACGGGAGG 359  
TEXMELUCAN GTCAAACCATCTCTTGCCCCTCCTAACCCCTC-TCATGGGGACGG-AGGGAAGTGGGAGG 358  
XALAPA \*\*\*\*\*

SINALOA CAACCCAT-AAACGCATTGACTAAGACGCCCTCCCTATGGGAGGATACATATTAACAAAC 418  
TABASCO CAACCCAT-AAACGCATTGACTAAGACGCCCTCCCTATGGGAGGATACATATTAACAAAC 418  
TLAHUAC CAACCCAT-AAACGCATTGACTGAGACGCCCTCCCTATGGGAGGATACATATTAACAAAC 417  
JIUTEPEC CAACCCAT-AAACGCATAGACTGAGACGCCCTCCCTATGGGAGGATACATATTAACAAAC 417  
HND2 CAACCCAT-AAACGCATAGACTGAGACGCCCTCCCTATGGGAGGATACATATTAACAAAC 417  
COYOTE CAACCCAT-AAACGCATAGACTGAGACGCCCTCCCTATGGGAGGATACATATTAACAAAC 417  
CGE CAACCCAT-AAACGCATAGACTGAGACGCCCTCCCTATGGGAGGATACATATTAACAAAC 417  
TECATE CAACCCAT-AAACGCATAGACTGAGACGCCCTCCCTAAGGGAGGATACATATTAACAAAC 416  
ENSENADA CAGCCCAT-AAACTTATTGACTGAGACGCCCTCCCTATGGGAGGATATACAATAACAAAC 345  
TEXMELUCAN CAACCCAT-AAACTTATTGACTGAGACGCCCTCCCTATGGGAGGATATACAATAACAAAC 418  
XALAPA CAACCCATAAAACTTATTGATTGAGACGCCCTCTCTATGGGAGGATATACAATAACAAAC 418  
\*\*\*\*\*

SINALOA GACTCTCAGCAACGGATATCTTGGCTCTTGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 478  
TABASCO GACTCTCAGCAACGGATATCTTGGCTCTTGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 478  
TLAHUAC GACTCTCAGCAACGGATATCTTGGCTCTTGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 477  
JIUTEPEC GACTCTCAGCAACGGATATCTTGGCTCTTGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 477  
HND2 GACTCTCAGCAACGGATATCTTGGCTCTTGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 477  
COYOTE GACTCTCAGCAACGGATATCTTGGCTCTTGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 477  
CGE GACTCTCAGCAACGGATATCTTGGCTCTTGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 477  
TECATE GACTCTCAGCAACGGATATCTTGGCTCTTGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATG 476  
ENSENADA GACTCTCAGCAACGGATATCTTGGCTCTTGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 405  
TEXMELUCAN GACTCTCAGCAACGGATATCTTGGCTCTTGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 478  
XALAPA GACTCT-----TGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 456  
\*\*\*\*\*

SINALOA CGTAATGTGAATTGCAGAAATCCGCGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCGCCCCG 538  
TABASCO CGTAATGTGAATTGCAGAAATCCGCGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCGCCCCG 538  
TLAHUAC CGTAATGTGAATTGCAGAAATCCGCGAATCATCGGGTCTTTGAACGCAACTTGCGCCCCG 537  
JIUTEPEC CGTAATGTGAATTGCAGAAATCCGCGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCGCCCCG 537  
HND2 CGTAATGTGAATTGCAGAAATCCGCGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCGCCCCG 537  
COYOTE CGTAATGTGAATTGCAGAAATCCGCGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCGCCCCG 537  
CGE CGTAATGTGAATTGCAGAAATCCGCGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCGCCCCG 537  
TECATE CGTAATGTGAATTGCAGAAATCCGCGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCGCCCCG 536  
ENSENADA CGTAATGTGAATTGCAGAAATCCGCGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCGCCCCG 465  
TEXMELUCAN CGTAATGTGAATTGCAGAAATCCGCGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCGCCCCG 538  
XALAPA CGTAATGTGAATTGCAGAAATCCGCGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCGCCCCG 516  
\*\*\*\*\*

SINALOA GGCTTGTTCCAAGGGCACGTCTGCCTGAGCGTCTCACGACCCACGCCACTCCCCCTCC 598  
TABASCO GGCTTGTTCCAAGGGCACGTCTGCCTGAGCGTCTCACGACCCACGCCACTCCCCCTCC 598  
TLAHUAC GGCTTGTTCCAAGGGCACGTCTGCCTGAGCGTCTCACGACCCACGCCACTCCCCCTCC 597  
JIUTEPEC GGCTTGTTCCAAGGGCACGTCTGCMTGAGCGTCTCACGACCCACGCCACTCCCCCTCC 597  
HND2 GGCTTGTTCCAAGGGCACGTCTGCCTGAGCGTCTCACGACCCACGCCACTCCCCCTCC 597  
COYOTE GGCTTGTTCCAAGGGCACGTCTGCCTGAGCGTCTCACGACCCACGCCACTCCCCCTCC 597  
CGE GGCTTGTTCCAAGGGCACGTCTGCCTGAGCGTCTCACGACCCACGCCACTCCCCCTCC 597  
TECATE GGCTTGTTCCAAGGGCACGTCTGAGCGTCTCACGACCCACGCCACTCCCCCTCC 596  
ENSENADA GGCTTGTTCCAAGGGCACGTCTGCCTGAGCGTCTCACGACCCACGCGCCACTCCCCACC 525  
TEXMELUCAN GGCTTGTTCCAAGGGCACGTCTGCCTGAGCGTCTCACGACCCACGCCACTCCCCACC 598  
XALAPA GGCTTGTTCCAAGGGCACGTCTGCCTGAGCGTCTCACGACCCACGCCACTCCCCACC 576  
\*\*\*\*\*

SINALOA ACTCGGTGGGATGGAGTAGCGGATATGGTTGTCCGTCGGAGCCCTTCTAGC----- 649  
TABASCO ACTCGGTGGGATGGAGTAGCGGATATGGTTGTCCGTTGGAGCCCTTCTAGC----- 649  
TLAHUAC ACTCGGTGGGATGGAGTAGCGGATATGGTTGTCCGTCGGAGCCCTTCTAGC----- 648  
JIUTEPEC ACTCGGTGGGATGGAGTAGCGGATATGGTTGTCCGTCGGAGCCCTTCTAGC----- 648  
HND2 ACTCGGTGGGATGGAGTAGCGGATATGGTTGTCCGTCGGAGCCCTTCTAGC----- 648  
COYOTE ACTCGGTGGGATGGAGTAGCGGATATGGTTGTCCGTCGGAGCCCTTCTAGC----- 648

CGE ACTCGGTGGGATGGAGTAGCGGAGATGGTTGTCCGTTGGAGCCCTTCTCGCACGCGTTGT 657  
TECATE ACTCGGTGGGATGGAGTAGCGGAGATGGTTGTCCGTTGGAGCCCTTCTAGC----- 647  
ENSENADA ATTTGGTGCACGGAGTGGCGGAAATGGTTGTCCGTTGGAGCCCTTCTTGACATGATGC 585  
TEXMELUCAN ATTTGGTGCACGGAGTGGCGGAAATGGTTGTCCGTTGGAGCCCTTCTTGACATGATGC 658  
XALAPA ATTTGGTGTGATGGAGTGGCGGAGATGGTTGTCCGTTGGAGCCCTTCTTGACATGATGC 636  
\* \* \* \* \*

SINALOA -----GGTTCTAGCGGTGCGCTGAAATGCATCGATTGCTCCGTGTGGCGATGCGTCG 701  
TABASCO -----GGCTCTAGCGGTGCGCTGAAATGCATCGATTGCTCCGTGTGGCGATGCGTCG 701  
TLAHUAC -----GGTTCTAGCGGTGCGCTGAAATGCATCGATTGCTCCGTGTGGCGATGCGTCG 700  
JIUTEPEC -----GGTTCTAGCGGTGCGCTGAAATGCATCGATTGCTCCGTGTGGYATGCGTCG 700  
HND2 -----GGTTCTAGCGGTGCGCTGAAATGCATCGATTGCTCCGTGTGGCGATGCGTCG 700  
COYOTE -----GGTTCTAGCGGTGCGCTGAAATGCATCGATTGCTCCGTGTGGCGATGCGTCG 700  
CGE GAGTAGTTGGCTCTAGCGGTGCGCTGAAATGCATCGATTGCTCTGTGTGGCGATGCGTCG 717  
TECATE -----GGTTCTAGCGGTGCGCTGAAATGCATCGATTGCTCCGTGTGGCGATGCGTCG 699  
ENSENADA GAGTATTTGGCACTAGCGGTGCGCTGAAATGCATCGATTGCTCCGTGTGGCGATGCGTCG 645  
TEXMELUCAN GAGTATTTGGCACTAGCGGTGCGCTGAAATGCATCGATTGCTCCGTGTGGCGATGCGTCG 718  
XALAPA GAGTACTTGGCACTAGCGGTGCGCTGAAATGCATCGATTGCTCCATGTGGCGATGCGTCG 696  
\* \* \* \* \*

SINALOA CAAGGGTGGTTGCTTCCCTCGGCCGCAAGGGATCCGAGATCGCAACTGTTGCGGCGTGT 761  
TABASCO CAAGGGTGGTTGCTTCCCTCGGCCTG-----CCGAGATCGCAACTGTTGCGGCGTGT 753  
TLAHUAC CAAGGGTGGTTGCTTCCCTCGGCCACAAGGGATCCGAGATCGCAACTGTTGCGACGTGT 760  
JIUTEPEC CAAGGGTGGTTGCTTCCCTCGGCCGCAAGGGATCCGAGATCGCAACTGTTGCGGCGTGT 760  
HND2 CAAGGGTGGTTGCTTCCCTCGGCCGCAAGGGATCCGAGATCGCAACTGTTGCGGCGTGT 760  
COYOTE CAAGGGTGGTTGCTTCCCTCGGCCGCAAGGGATCCGAGATCGCAACTGTTGCGGCGTGT 760  
CGE CAAGGGTGGTTGCTTCCCTCGGCCGCAAGGG-ATCTGAGATCGCAACTGTTGCGGCGTGT 776  
TECATE CAAGGGTGGTTGCTTCCCTCGGCCGCAAGGGATCCGAGATCGCAACTGTTGCGGCGTGT 759  
ENSENADA CAAGGGTGGTTGCTTCCGTAGCCCGTCAAGGGTCCGAGATTGCAACTATTGCGACGCGT 705  
TEXMELUCAN CAAGGGTGGTTGCTTCCGTAGCCCGTCAAGGGTCCGAGATTGCAACTATTGCGACGCGT 778  
XALAPA CAAGGGTGGTTGCTTCCGTAGCCCATCAAGGGTCCGAGATTGCAACTGTTGCGATGTT 756  
\* \* \* \* \*

SINALOA TACCCGATCAAGGATGCTTATATCGAGTCGGGCTAATCGATCTGAGCATTACGTCCATTT 821  
TABASCO TACCCGATCAAGGATGCTTATATCGAGTCGGGCTAATCGATCTGGGCATTACGTCCATTT 813  
TLAHUAC TACCCGATCAAGGATGCTTATATCGAGTCGGGCTAATCGATCTGAGCATTACGTCCATTT 820  
JIUTEPEC TACCCGATCAAGGATGCTTATATCGAGTCGGGYTAATCGATCTGAGCATTACGTCCATTT 820  
HND2 TACCCGATCAAGGATGCTTATATCGAGTCGGGCTAATCGATCTGAGCATTACGTCCATTT 820  
COYOTE TACCCGATCAAGGATGCTTATATCGAGTCGGGCTAATCGATCTGAGCATTACGTCCATTT 820  
CGE TACCCGATAAAGGATGCTTTTATCGAGTCGGGCTAATCGATTGGGCATTACGTCCATTT 836  
TECATE TACCCGATCAAGGATGCTTATATCGAGTCGGGCTAATCGATCTGAGCATTACGTCCATTT 819  
ENSENADA TTCCCGTTAAGGATGCATCTATCGAGTCGGGCTGATCGTTCTGGGCGTT----- 755  
TEXMELUCAN TTCCCGTTAAGGATGCATCTATCGAGTCGGGCTGATCGTTCTGGGCGTT----- 828  
XALAPA TTCTCGTT-----TATCGAGTCGGGCTAATCGTTCTAGGTGTT----- 794  
\* \* \* \* \*

SINALOA GCTTCGTGCACCTTTGGCGTTATGCCTAGACCGAAACCATCGAACGGACCTCAGATCAGGC 881  
TABASCO GCTTCGTGCAGTTTGGCGTTATGCCTAGACCGAAACCATCGAACGGACCTCAGATCAGGC 873  
TLAHUAC GCTTCGTGCATTTTGGCGTTATGCCTAGACCGAAACCATCGAACGGACCTCAGATCAGGC 880  
JIUTEPEC GCTTCGTGCACCTTTGGCGTTATGCCTAGACCGAAACCATCGAACGGACCTCAGATCAGGC 880  
HND2 GCTTCGTGCAGTTTGGCGTTATGCCTAGACCGAAACCATCGAACGGACCTCAGATCAGGC 880  
COYOTE GCTTCGTGCACCTTTGGCGTTATGCCTAGACCGAAACCATCGAACGGACCTCAGATCAGGC 880  
CGE GCTTCGTGCACCTTTGGCGTTATGCCTAGACCGAAACCATCGAACGGACCTCAGATCAGGC 896  
TECATE GCTTCGTGCACCTTTGGCGTTATGCCTAGACCGAAACCATCGAACGGACCTCAGATCAGGC 879  
ENSENADA -----GCCTAGTCCGAAACTACAAAACGGACCTCAGATCAGGC 793  
TEXMELUCAN -----GCCTAGTCCGAAACTACAAAACGGACCTCAGATCAGGC 866  
XALAPA -----GCCTAGACCGAAACTATCAAAACGGACCTCAGATCAGGC 832  
\* \* \* \* \*

SINALOA GAGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAATCACGAATTC 934  
TABASCO GAGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGG--ATCACGAATTC 924  
TLAHUAC GAGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGG--ATCACGAATTC 931  
JIUTEPEC GAGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAATCACGAATTC 933  
HND2 GAGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAATCACGAATTC 933  
COYOTE GAGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAATCACGAATTC 933  
CGE GAGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGG-AATCACGAATTC 949  
TECATE GAGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGG-AATCACGAATTC 931  
ENSENADA GAGATTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGG-AATCACGAATTC 845  
TEXMELUCAN GAGATTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGG-AATCACGAATTC 918  
XALAPA GAGACTACCCGCTGACTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGG-AATCACGAATTC 884  
\* \* \* \* \*

## Short-Term Effects of Arsenate-Induced Toxicity on Growth, Chlorophyll and Carotenoid Contents, and Total Content of Phenolic Compounds of *Azolla filiculoides*

Gabriela Sánchez-Viveros ·  
Ronald Ferrera-Cerrato · Alejandro Alarcón

Received: 7 February 2010 / Accepted: 10 August 2010  
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

**Abstract** This study evaluated the toxic effects of arsenic (As) on the growth, total antioxidant activity, total content of phenolic compounds, and content of photosynthetic pigments of *Azolla filiculoides*. The aquatic fern was propagated and exposed to Yoshida nutrient solution contaminated with sodium arsenate ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) at six concentrations (5, 10, 20, 30, 60, and 120  $\mu\text{g As mL}^{-1}$ ), including the control without As contamination. *Azolla* cultures were kept under environmental chamber conditions 26°C, 12 h photo-period and 80% HR for 96 h. Increased As concentrations ( $>30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) significantly diminished growth of *A. filiculoides* and the total content of chlorophyll and total phenolic compounds, but significantly enhanced total carotenoid+xanthophylls content. The concentrations of 5 and 10  $\mu\text{g As mL}^{-1}$  significantly stimulated the growth of *A. filiculoides*. This aquatic fern tolerates As concentrations lower than 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , and its maximum As accumulation (28  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight) was achieved when exposed to 60  $\mu\text{g As mL}^{-1}$ , but showing clear symptoms of As toxicity.

**Keywords** Aquatic fern · Metalloid · As toxicity · As accumulation · Growth stimulation

G. Sánchez-Viveros · R. Ferrera-Cerrato · A. Alarcón (✉)  
Área de Microbiología, Postgrado de Edafología,  
Colegio de Postgraduados,  
Carretera México-Texcoco Km 36.5.,  
Montecillo 56230 Estado de México, Mexico  
e-mail: aalarconcp@gmail.com

### 1 Introduction

Arsenic (As) is an inorganic pollutant widely distributed in nature whose main chemical forms are arsenic sulfide and arsenopyrite (Matschullat 2000), and is considered one of the most toxic pollutants for living organisms (Rudra et al. 2006). Natural occurring As depositions in surface and groundwater may result from geological processes such as rock weathering, erosion, and lixiviation (Lepp 1981). However, industrial and mining activities also represent the main As sources for water bodies, where this metalloid is one of the most critical environmental concerns due to its high toxicity, persistence, and ability to accumulate in living organisms (Bruce et al. 2003). Main As form in water is represented as insoluble compounds like  $\text{As}^{5+}$  or  $\text{As}^{3+}$  (Lesikar et al. 2006). In surface water, As may be toxic for aquatic plants at concentrations lower than 2  $\mu\text{g L}^{-1}$ , though concentrations close to 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  can be toxic for fish, thus, As tends to be an environmental hazard to human health (Rahman et al. 2007; Miller et al. 2007).

Phytoremediation has been proposed for cleaning up both soil and surface water contaminated with heavy metals so that plants are able to contain, remove, or neutralize them (Salt et al. 1998; Gravisu et al. 2002; Pilon-Smits 2005). Among those plants directed to phytoremediation processes, fern species possess the ability to accumulate metalloids such as As, and may reach levels of contaminants that overpass those concentrations that represent toxicity



**Full Length Article**

## Copper Effects on Photosynthetic Activity and Membrane Leakage of *Azolla filiculoides* and *A. caroliniana*

GABRIELA SÁNCHEZ-VIVEROS, DANIEL GONZÁLEZ-MENDOZA<sup>1†</sup>, ALEJANDRO ALARCÓN AND RONALD FERRERA-CERRATO

Área de Microbiología, Postgrado de Edafología, Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México

<sup>†</sup>Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California (ICA-UABC), Carretera a Delta s/n Ejido Nuevo León, 21705, Baja California, México

<sup>1</sup>Corresponding author's e-mail: daniasaf@gmail.com

### ABSTRACT

The toxic effects of copper on the photosynthetic apparatus and cell membrane stability of *Azolla* species were evaluated by means of the chlorophyll fluorescence, leakage of electrolytes and total phenolic compounds. Different collects from *Azolla filiculoides* (Xalapa & Ensenada) and *A. caroliniana* (CEG) were incubated with different Cu<sup>2+</sup> concentrations (0.02, 0.2, 1 & 2 mM) for 36 h in a plant growth chamber. The results showed that treatments with higher Cu concentration (1 & 2 mM) presented clear signs of disrupted photosystem II, since the potential photochemical yields (Fv/Fm) were lower than the control responses. However, membrane permeability (leakage of electrolytes) of both species significantly enhanced with the increase in Cu concentration after 12 h of exposure. Additionally, total phenolic constituents of both species did not differ significantly by Cu concentrations excepting for lower doses of Cu (0.02 mM) after 36 h of exposure. In conclusion, chlorophyll fluorescence analysis can be used as a useful physiological tool to assess early changes in photosynthetic performance of *Azolla* in response to heavy metal pollution. © 2010 Friends Science Publishers

**Key Words:** Photosynthetic; *Azolla*; Chlorophyll

### INTRODUCTION

The Mexicali Valley is located in northeastern Baja California, south of the Imperial Valley in California. Approximately 70% of the cultivated land in Mexicali is irrigated with water from the Colorado River by which elevated concentrations of heavy metals in agricultural drain also receives brine waste with potentially high concentrations of heavy metals from a geothermal energy plant located at Cerro Prieto in the middle of the agricultural valley, approximately 30 km south of the city of Mexicali. Due to their occurrence and persistence in aquatic pollution, metals are one group of contaminants commonly assessed (Johnston *et al.*, 2009). Copper (Cu<sup>2+</sup>) is an essential plant micronutrient and often occurs in high concentrations in the aquatic ecosystems (Chen *et al.*, 2007; Rauf *et al.*, 2009). In addition, Cu has become a widespread contaminant due to its use as a mineral pesticide in agriculture (e.g., CuSO<sub>4</sub> in Bordeaux mixture) (Ahmad *et al.*, 2008). On the other hand some plants have been demonstrated to accumulate heavy metals and other nutrients from contaminated waters and they may be directed to phytoremediation processes (Mkandawire *et al.*, 2004). However, selection of plant species for removing metal ions from polluted water will

also depend on their growth rate, level of tolerance to heavy metals and concentration of metals in the environment (Garbisu *et al.*, 2002). In this sense, the aquatic fern *Azolla* has been reported to accumulate high concentration of heavy metals and metalloids (3-4 mgL<sup>-1</sup>) from aqueous media (Khosravi *et al.*, 2005; Rai *et al.*, 2009). *Azolla* ferns are worldwide distributed and grow in all kinds of fresh and *Azolla* may detoxify aquatic contaminated with heavy metals, specifically in the region of the valley of Mexicali, Baja California (Mexico).

However, even though, it is known that small amounts of metals are accumulated in frond of *Azolla* species, their tolerance and physiological responses have been scarcely studied. The aim of this work was to investigate the characteristics of PSII photochemistry induced by Cu<sup>2+</sup> and also to evaluate the use of chlorophyll fluorescence, leakage of electrolytes and total phenolic compounds as possible indicators for heavy metal stress in *Azolla* ferns.

### MATERIALS AND METHODS

**Biological material and experimental conditions:** The Mexican accessions of *Azolla filiculoides* (Xalapa), *A. filiculoides* (Ensenada) and *A. caroliniana* (CEG), were

**To cite this paper:** Sánchez-Viveros, G., D. González-Mendoza, A. Alarcón and R. Ferrera-Cerrato, 2010. Copper effects on photosynthetic activity and membrane leakage of *Azolla filiculoides* and *A. caroliniana*. *Int. J. Agric. Biol.*, 12: 365-368