

Sistema innovador de cultivos in vitro inoculados con simbioses rizosféricas MVA y bacterias surfactantes como fitoremediador de suelos contaminados con agrotóxicos

Innovative system of in vitro cultures inoculated with rhizospheric symbionts MVA and surfactant bacteria as a phytoremediator of soil contaminated with agrottoxins

Ph.D. Francisco A. Simón Ricardo

R. Mayet

Universidad de Oriente, Cuba

Autor para correspondencia: fsimon@fiqa.uo.edu.cu, francisco.simon@utelvt.edu.ec

Fecha de recepción: 03 de Agosto de 2017 - Fecha de aceptación: 10 de Agosto de 2017

Resumen: La presente innovación se basa en el empleo de cultivos in vitro, (vitro plantas) con la finalidad de propiciar la fitorremediación de suelos contaminados con agrotóxicos, en particular por el uso mantenido de herbicidas, mediante un sistema compuesto por suelo-plantas inoculadas con simbioses micorizosféricas MVA y bacterias surfactantes. En la investigación, se aplicó el herbicida triazínico ametrina de gran persistencia en el suelo y evaluaron tres especies de MVA: *Rhizophagus intrarradices*; *Glomus. Fasciculatum* y *Fummeliformis moseae* inoculadas a plántulas de banano (*Musa paradisiaca*) clon tetraploide FHIAT comercial 0630 en fase de adaptación, incorporando la bacteria productora de agentes surfactantes *Pseudomonas fluorescens* cepa PsFS520505. Entre los resultados, se comprobó el alto grado de micorrización alcanzado, superior con *R. intrarradices* (77%) seguido por *G. fasciculatum* (67%) y *F. mosseae* (43%). En cambio, la capacidad fitorremediadora del sistema evaluado en fase de alistamiento, resultó más efectivo con *G. fasciculatum* (60.7%); seguido por *R. intrarradices* (51.2 %) y *F. mosseae* (4.2 %). Se realizó la extensión en campo con la mejor variante integral MVA *G. fasciculatum*, y *P. fluorescens* lográndose a los 30 días la biodegradación del 38.4 % de la ametrina residual y el 80 % de sobrevivencia de las plantas lo que le confiere trascendental importancia, al demostrarse una vía agroecológica para la integración de la lucha química y el medio ambiente en el contexto del uso de herbicidas. En campo los resultados duplicaron el efecto fitoremediador del sistema logrando biodegradar el 90% del agrotóxico en un plazo de 60 días.

Palabras clave: fitoremediación; vitro plantas; micorrizas MVA simbioses micorizosféricas; bacterias surfactantes

Abstract: The present innovation is based on the use of in vitro cultures (vitro plants) in order to promote the phytoremediation of soils contaminated with pesticides, in particular by the sustained use of herbicides, through a system composed of soil-inoculated plants with mycorrhizal MVA symbionts and bacterial surfactants. In the research, the herbicide triazine ametrine of great persistence was applied to the soil and evaluated three species of MVA: *Rhizophagus intrarradices*; *Glomus. Fasciculatum* and *Fummeliformis moseae* inoculated with banana (*Musa paradisiaca*) tetraploid clone FHIAT commercial 0630 in the adaptation phase, incorporating the bacterium producing surfactant *Pseudomonas fluorescens* strain PsFS520505. Among the results, the high degree of mycorrhizae reached was higher, with *R. intrarradices* (77%) followed by *G. fasciculatum* (67%) and *F. mosseae* (43%). On the other hand, the phytoremediative capacity of the evaluated system in the enlistment

phase, was more effective with *G. fasciculatum* (60.7%); followed by *R. intrarradices* (51.2%) and *F. mosseae* (4.2%). Extension in the field with the best integral variant MVA *G. fasciculatum* and *P. fluorescens* was carried out at 30 days the biodegradation of 38.4% of the residual amethrin and 80% of plant survival, conferring transcendental importance, demonstrating an agroecological approach for the integration of chemical and environmental control in the context of the use of herbicides. In the field, the results doubled the phytoremediator effect of the system and biodegraded 90% of the pesticide within 60 days.

Key words: phytoremediation; vitro plants; mycorrhizas MVA mycorrhizal symbionts; bacterial surfactants

Introducción

Los Agrotóxicos, conocidos por plaguicidas, constituyen uno de los principales contaminantes de los suelos y el ambiente en general [1-3]; sin embargo, a pesar del conocimiento que se tiene de esta problemática, su uso es aún una práctica habitual para el control de plagas, enfermedades y malezas que dañan a los cultivos, en cierto sentido por carencia de medios más efectivos y seguros.

Por lo antes expresado, cualquier intento que mitigue su impacto constituye una alternativa que debe ser aplicada, una vez demostrada su eficacia y viabilidad práctica. Estas razones condujeron a desarrollar esta Biotecnología de Fitoremediación [4], en fase de extensión a la que su autor le ha designado el nombre comercial de Filtros Ecológicos [3].

Basado en estos principios, se diseñó y planificó esta investigación [5,6], con vista a propiciar la biodegradación in situ acelerada de agrotóxicos, su reciclaje y reconversión en desechos “no tóxicos” asimilables por las plantas como fuente de carbono y otros macro y micro elementos esenciales, en el caso que ocupa, específicamente de herbicidas. Para satisfacer esta necesidad, se tuvo en cuenta el empleo de cultivos in vitro por la capacidad reproductiva de esta tecnología en la producción de plantas, su bajo costo y fácil manipulación para emprender estos estudios agroecotoxicológicos [5,6].

Atenido a todas las consideraciones expuestas, esta investigación aborda una temática en la que apenas se ha incursionado, que da una respuesta a esta problemática acuciante de la Agricultura moderna, o al menos mitigar los riesgos inherentes al uso prolongado de herbicidas, sobre todo de aquellos de efecto residual, que contaminan los suelos y de hecho el medio ambiente circundante.

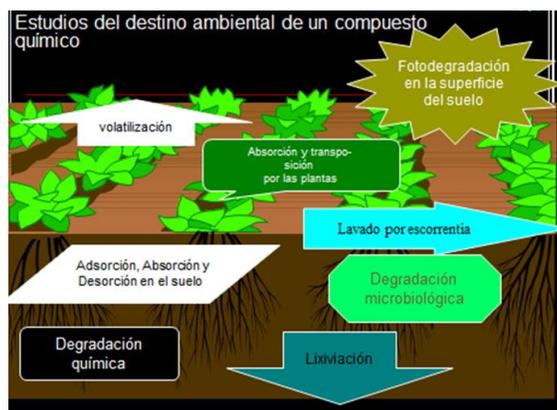


Figura 1.- Esquema del destino de contaminación ambiental de los agrotóxicos aplicados en la agricultura

Marco Teórico

Basado en las experiencias que por más de dos décadas de estudios se tiene de los hongos micorrizógenos MVA, su capacidad absorbente de contención de elementos minerales y otros compuestos asimilables por las plantas; y Fito remediadora de los suelos, y la acción combinada de simbiontes rizosféricos del grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes con propiedades tenso activas de sus metabolitos que tienen capacidad de degradación de compuestos orgánicos contaminantes, se diseñó este sistema innovador que de forma práctica y a los efectos comercial se denominó Filtros Ecológicos, constituye una Biotecnología de Fitorremediación natural para la Protección de las Cuencas Hidrográficas amenazadas del impacto que producen los Agroquímicos, Agrotóxicos y el Vertimiento de Residuales Agroindustriales y de la minería.

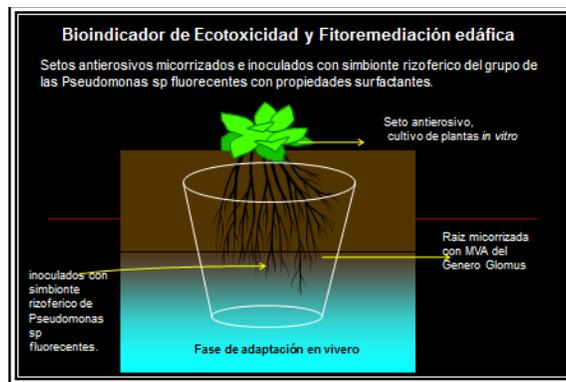


Figura 2.- Esquema simplificado del sistema Fito remediador de los suelos contaminados por agrotóxicos

La Fito remediación por tanto, entraña múltiples procesos bioquímicos realizados por las plantas y sus microorganismos asociados que conducen a la reducción, mineralización, degradación, estabilización y volatilización de dichos contaminantes [11,12]. De este modo, se aprovechan las habilidades naturales de las plantas para extraer, acumular, precipitar, almacenar o degradar compuestos inorgánicos y orgánicos; por tanto, puede considerarse un conjunto de técnicas y procesos bioquímicos o biotecnológicos naturales mediante el uso de plantas y microorganismos simbiontes rizosféricos asociados que posibilitan la recuperación paulatina ambiental.

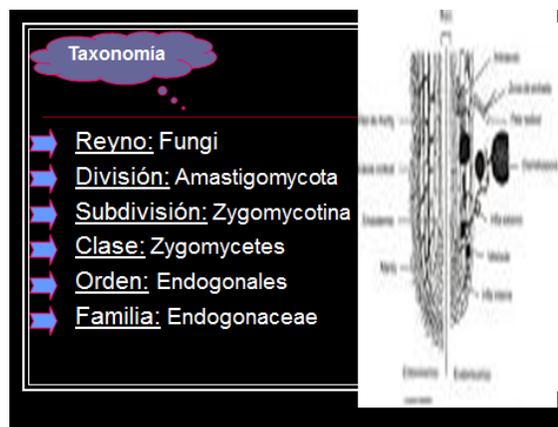


Figura 3.- Ubicación taxonómica de las micorrizas MVA simbiotes rizosféricos

remediación: (1) Degradación acelerada (destrucción del contaminante en menos tiempo); (2) Extracción y (3) Contención/inmovilización de contaminantes.

De hecho, se puede considerar una larga lista de compuestos virtualmente contaminantes que al menos pueden tener una solución sino del 100%, de cierto grado de satisfacción en la reducción de los niveles de contaminación y minimizar el riesgo tóxico o contaminantes al medio en cuestión. Entre ellos, contaminantes inorgánicos como los propios excedentes de fertilizantes químico que quedan absorbidos por los coloides del suelo, metales pesados (micronutrientes o no): Fe, Cu, Mn, Mo, Zn, Cr, Ni, Cd, Co, Hg, Pb, V, W; otros elementos tóxicos como resultado de la minería: As, Se, F y compuestos órgano sintéticos como los plaguicidas y derivados del petróleo como disolventes, explosivos, lacas, pinturas, y envases a base polipropileno [15].

Estudios cinéticos llevados a cabo por Simón [8], acerca de este proceso de biodegradación acelerada de plaguicidas mediante estos sistemas de Fito remediación muestran (Figuras 4; Tabla 1), valores de las constantes aparentes de velocidad en reacciones cinéticas de primer orden con valores 3.3 veces superiores respecto a la degradación natural de las variantes testigo, lo que conduce a menor tiempo de prevención o plazo de seguridad del uso de estos plaguicidas.

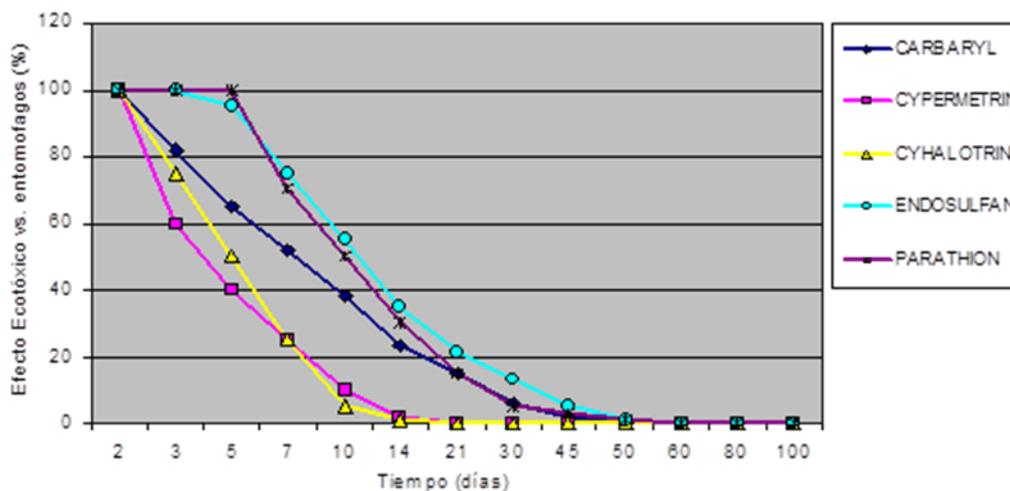


Figura 4.- Curvas de efecto vs tiempo de insecticidas en suelo.

Tabla 1.- Cinética de biodegradación de insecticidas en suelo con setos micorrizados. Efecto detrimental sobre la lombriz de tierra Eisenia foetida.

Insecticidas Ensayados	Deposito* Mg I.A.	Constante De Velocidad 1/Días	Coef. Correlac.	Tiempos (Días) De:	
				Vida Media	Prevención
Dimetoato	60	-0.558	-0.852	1.2	7.4
Disulfoton	3000	-0.046	-0.682	14.5	175.2
Aldicarb	3000	-0.051	-0.911	13.1	157.8
Carbofuran	3000	-0.052	-0.951	13.4	161.2
Carbaryl	340	-0.451	-0.852	1.5	12.8
Cypermethrin	80	-0.642	-0.684	1.1	6.9
Cyhalothrin	5	-1.512	-0.752	0.5	1.1

Endosulfan	600	-0.105	-0.905	6.4	61.3
Metamidofos	240	-0.602	-0.696	1.1	9.2
Parathion	160	-0.445	-0.754	1.5	11.2

En el caso de los compuestos orgánicos contaminantes, estos son degradados en el propio lugar de depósito, absorbidos y después de degradados, -“secuestrados” y algunos volatilizados; todo esto en dependencia de la complejidad de su estructura química, grupo funcional y presencia y complejidad de anillos aromáticos tipo benceno, antraceno etc., lo cual hace más lento y prolongado el proceso cinético de biodegradación [15].

Todos estos procesos pueden ser modificados, en oportunidades acelerados mediante manejo de factores agroecológicos, entre ellos: abióticos (condiciones edafoclimáticas), tales como relacionadas con el clima, las temperaturas, la humedad relativa, las precipitaciones y su frecuencia, el rocío, la intensidad luminosa directa o difusa, y en cuanto a las condiciones edáficas, las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, como textura y estructura del suelo, grado de compactación, tipo de suelo arenoso o arcilloso, pH del suelo, y muy importante entre los factores bióticos la composición de la flora microbiana diversa y abundante; la biodiversidad de flora y fauna tanto macro y microbiológica, la fertilidad de los suelos, el contenido en materia orgánica (ácidos húmicos); respecto al factor filogenético dependerá cuan más activa sea la capacidad bioquímica metabólica de las especies botánicas para participar en los procesos biodegradativos en simbiosis con los microorganismos rizosféricos asociados; de esta propiedad dependerá la capacidad fitoremediadora tanto de las especies de plantas como de los microorganismos asociados, que le permitirán actuar en suelos con diferentes pH, salinidad y humedad. Por último, el factor antropogénico, mediante la conducción de medidas tendientes a la mejora y conservación de los suelos como el arroje, siembra de coberturas vivas, y abono verde como el caso de leguminosas plantas fijadoras de nitrógeno, manejo de arvenses y vegetación espontánea, el barbecho, la rotación de cultivos, laboreo mínimo del suelos, construcción de canales de drenaje, son medidas constructivas del hombre que propician condiciones favorables para biodegradación y en particular, la Fito remediación de substratos contaminados [6].

Es oportuno distinguir, que en el caso de los compuestos inorgánicos, no pueden ser del todo degradados, sin embargo pueden ser “estabilizados” en el suelo y “secuestrados” en tejidos colectables y más importante aún, atrapados por microorganismos simbioses rizosféricos como las Micorrizas, sobre todo por las especies conocidas como MVA (micorrizas-vesículo-arbusculares), que atrapan del suelo estos minerales y los transportan desde grandes distancias a las plantas y el resto lo fijan en sus estructuras vesiculares donde se producen enzimas capaces de utilizar estos compuestos en la síntesis de hormonas de crecimiento a base de auxinas, giberelinas y citoquinas [16-19]. En estas estructuras de empalizadas conformadas por hifas reproductivas de estos hongos, se alojan estos compuestos muchos de los cuales se transforman en kairomonas con efecto repelentes de plagas y nematodos, otras conducen a la capacidad de algunas plantas de inhibir el crecimiento de otras especies en su entorno (alelopatía) y otras potencian por sinergia la capacidad fitoremediadora del sistema seto-MVA [19].

En sentido general, la forma más simple de Fito remediación es la natural, ya que los procesos involucrados, ocurren de forma espontánea, en cierta medida, de forma natural, sólo que dependerá de su capacidad fitoremediadora para ser considerada válida, para ser aplicada de forma inducida como un sistema biotecnológico Fito remediador [8,16].

Hay que reconocer que todo ecosistema presenta la capacidad de absorber perturbaciones y regresar a su estado original una vez que la perturbación ha terminado; por ello, en todo ensayo previsto para validar la capacidad fitoremediadora del sistema seto-simbiontes rizosférico, deberá tomarse en consideración el aporte individual de cada componente y de este modo ir sustituyendo los menos eficientes por tratamientos o variantes verdaderamente efectivos; por otro lado pueden contraponerse por antagonismo determinados componente que lejos de mostrar sinergia en el proceso biodegradativo, ocurren efectos contrarios con realce de ecofitotoxicidad [16].

Por lo antes expresado, durante los bioensayos de fitoremediación, deberán evaluarse determinadas variantes de los componentes integrantes del sistema biotecnológico, estimando en cada caso lo que se ha considerado evaluar como “capacidad fitoremediadora” del sistema seto-simbiontes rizosféricos [16]. En primer lugar está el componente seto o planta. Entre las características recomendadas a considerar en el uso de una determinada especie botánica, está su crecimiento, el cual debe ser de crecimiento rápido; elevada producción de biomasa; resistentes o al menos tolerantes a la contaminación en los rangos de concentración que habitualmente aparece el contaminante en los ecosistemas naturales o artificiales (agro ecosistemas). Es válido considerar su Resistencia y Competitividad en cuanto a condiciones adversas de hábitat; para ello, es más recomendable el uso de especies nativas. Esto implica reproducción de plantas que ya se encuentren creciendo en el lugar contaminado, pues de hecho ya son tolerantes al contaminante, en todo caso el próximo paso en los bioensayos es validar el componente microbiológico relacionado con el simbiote rizosférico nativo o incorporado al sistema.

En el caso particular de las plantas, su función específica es extraer agua y minerales del suelo y liberar sustancias (enzimas), que contribuyan a biodegradar el contaminante, en todo caso movilizarlo, es decir propiciar su remoción y disolución en los coloides del suelo para acercarlo y ponerlo en contacto a disposición de los microorganismos capaces de realizar su función biodegradativa acelerada para ello, es importante la actividad fisiológica de las plantas, las cuales secretan por sus raíces exudados que contienen azúcares, aminoácidos, nutrientes, lo cual constituye la base mutualista de los microorganismos simbioses rizosféricos, tal es el caso de los hongos micorrizógenos en particular las micorrizas vesículo-arbusculares (MVA).

Hay que reconocer como factores agroecológicos importantes mencionados con antelación, el efecto físico de ahuecamiento del suelo por las raíces, lo cual facilita la aireación y circulación de agua, evitando de este modo estancamiento o encharcamiento, sabido que la mayoría de los microorganismos que intervienen en estos procesos que habitan en las capas más superficiales, (horizonte A), son aerobios o aerobios facultativos, por lo que aumenta la actividad microbiana. Labores culturales y agrotécnicas como labranza mínima, drenaje, aporque, e incorporación de materia orgánica entre otras, mejoran notablemente las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos, propiciando condiciones favorables que coadyuvan la capacidad fitoremediadora del sistema biotecnológico establecido.

En resumen, la Fitoremediación, es una tecnología emergente concebida recientemente por algunos autores [7-10]. como un conjunto de procesos físicos, químicos y biológicos de gran complejidad que actúa sobre contaminantes orgánicos y xenobióticos: hidrocarburos,

plaguicidas, tenso activos, compuestos clorados, azufrados, fosforados y nitrogenados propiciando su transformación química mediante metabólicos internos o externos que conduce a la detoxificación, al menos parcial (fitoestimulación), producto de la biodegradación microbiana de contaminantes, activada o mejorada por la presencia de microorganismos simbioses rizosféricas. En la que se usan diversas especies vegetales para extraer, contener, degradar o inmovilizar contaminantes del suelo y agua. Varias especies se consideran hiperacumuladoras de metales pesados, sin embargo la mayoría tienen altos requerimientos de agua para su desarrollo.

Además, no hay estudios suficientes sobre plantas adaptadas a las condiciones de zonas áridas y que tengan características de absorción y acumulación de metales pesados y puedan emplearse en la remediación de áreas contaminadas. Esto es esencial en virtud de que el factor limitante para la producción de biomasa vegetal en las zonas áridas es el agua. Un programa para reducir los metales contaminantes de suelos en zonas áridas deberá apoyarse en especies vegetales que entre sus características se encuentre la de tolerar sequía y tener un uso consuntivo de agua reducido.

Jabaji-Hare y Kendrick [9], refieren que bajo la acción de los microorganismos, particularmente atribuidas a la presencia de bacterias rizosféricas del género *Pseudomonas*, catalizado por la acción conjunta de la arcilla y la caliza [10], que actúan en la formación de metabolitos producidos "in situ" fácilmente biodegradables, utilizados posteriormente por los microorganismos del suelo, -incluidas las propias micorrizas- como fuente asimilable de Carbono, Fósforo y Nitrógeno [7-10].

Estos autores han demostrado que las arcillas, por su constitución estructural laminar, tienen la capacidad de almacenar y concentrar la materia orgánica entre las láminas que caracterizan su estructura, favoreciéndose en una primera etapa las reacciones de condensación, para luego ocurrir reacciones químicas de oxidación de la materia orgánica en las proximidades de su interfase, debido a la concentración de iones que tiene lugar, que propicia la actividad catalítica con una capacidad oxidante exacerbada. Posteriormente, la capacidad adsorptiva de las micorrizas, complementan la acción del filtrado y retención en los setos antierosivos de la foresta arbustiva empleada [8].

Metodología

Se diseñó esta biotecnología fitoremediadora con vista a propiciar la biodegradación "in situ" acelerada de agrotóxicos, en particular de herbicidas, utilizando las capacidades contentivas y biodegradadoras de hongos micorrizógenos (MVA) del género *Glomus* y bacterias simbioses rizosféricas del grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes; utilizando particularmente, la capacidad tenso activa de emulsionar las grasas, y acelerar la biodegradación de agrotóxicos órgano sintéticos, propiedad intrínseca de los biosurfactantes.

Para lograr este propósito, fue necesario el aislamiento previo de endófitos nativos tanto de especies de hongos MVA y de simbioses rizosféricas de *Pseudomonas* fluorescentes por estar adaptadas al medio y por tanto, mostrar capacidad biodegradativa superior a los denominados microorganismos de "vitrina". Estas experiencias propias [8], sentaron las bases de esta biotecnología que ha logrado resultados innovadores en diferentes escenarios donde se está implementando

Aislamiento de endófitos nativos de MVA y Pseudomonas fluorescentes (Psf).

Se realizó el aislamiento y comprobación de endofito(s) nativo(s) de micorrizas vesículo-arbusculares (MVA), a partir del propio suelo donde se realizaron aplicaciones del plaguicidas, lo cual permitió la reinoculación en el mismo suelo con un hongo MVA más agresivo ecológicamente y bien adaptado al agroecosistema de referencia; para ello se realizó el aislamiento en etapas sucesivas mediante una selección inicial de esporas, observaciones periódicas de las que se forman en simbiosis con las plantas hospederas, relacionando la infección radicular con la producida por distintas especies de endofitos. Este procedimiento se adaptó al establecidos por Camprubi et al. [20]. Esto implicó la recolección en las propias áreas donde se llevaron a cabo las aplicaciones de plaguicidas, de raíces de flora natural, escogiendo muestras de suelo rizosférico, en 5 puntos al azar.

Las raíces se clarificaron y tiñeron para observar la presencia de infección micorrízica en el córtex radicular y las muestras de suelo se procesaron por el método clásico de centrifugación-flotación adaptado por Furlan y Fortin [21], para recuperar esporas vegetativas de los endófitos nativos formadores de MVA, por tamizado según Abbott y Robson [22].

De las propias raíces trozadas que se realizó el aislamiento de endofitos nativos MVA, se procedió al aislamiento de Pseudomonas spp. Fluorescentes presentes como simbiosis rizosféricas siguiendo el procedimiento descrito por Mercadé [23]. A las cepas seleccionadas se realizó su caracterización morfofisiológica basado en los criterios del diagnóstico de Mercadé [23] y Matsuyama et, al., [24] que comprende: 1) Tinciones de Gram; 2) Morfología del crecimiento celular en placas con medio de cultivo TSA a los 7 días de incubación; y 3) Propiedades bioquímicas: Reacción de Hugh y Leifson (oxidación/fermentación) y Reacción de la oxidasa.

Se obtuvieron sus metabolitos secundarios (biosurfactantes) por fermentación en medio líquido con enriquecimiento suplementado con el agrotóxico en continua agitación (200 r.p.m.), durante 120 horas y su posterior centrifugación, para separar el sobrenadante que se utilizó en las pruebas físico-químicas: 1) Ensayo de la gota colapsada; 2) Emulsificación del xileno y 3) Capacidad tenso activa del metabolito (actividad enzimática), acorde con los métodos descritos por Mercadé [23] y Mulligan et. Al. [25]. Estas pruebas se basan en la capacidad del metabolito tenso activo de emulsionar las grasas, propiedad intrínseca de los biosurfactantes.

Una vez vencida esta etapa de disponer de aislados de los simbiosis tanto de los endófitos MVA como de las Pseudomonas fluorescentes con capacidad fitoremediadora comprobado, se pasó a la segunda etapa, relacionada con la inoculación de las vitro plantas en fase de adaptación

Micorrización e inoculación de Psf.

La inoculación y comprobación de su reinfección, se llevó a cabo en vivero en fase de adaptación de las vitro plantas de banano clon tetraploide FHIAT comercial 0630, directamente en las bolsas de polietileno cuyo suelo fue previamente micorrizado con raíces infectadas

troceadas con un 60% de infección interna, además de esporas MVA de resistencia en distintos estadios de desarrollo (50 esporas + 10 esporocarpos/10 g de suelo). Transcurridas 3 semanas de la micorrización, se inocularon las plántulas con 30 cm³ de la suspensión bacteriana de concentración final de 9 x 10⁸ ufc/ml para lo cual se utilizó una jeringuilla plástica que permitió depositar el inóculo en la zona rizosférica.

A las 12 semanas, se realizaron muestreos de suelo y radículas de las vitro plantas para determinar el porcentaje de raíces micorrizadas y de recuperación de esporas de resistencia MVA según [20] y el re-aislamiento del simbionte rizosférico Psf según Furlan y Fortin [21].

Capacidad Fitoremediadora del Sistema innovador.

La evaluación de la capacidad infestiva del sistema suelo-seto-simbiontes MVA+Psf se realizó siguiendo el método utilizado por Pérez y Leguizamón [26].

Los bioensayos para evaluar la capacidad fitoremediadora del sistema se realizó en condiciones de semicampo en fase de alistamiento de las vitro plantas según el diseño experimental que se muestra a continuación:

No.	Variantes	Descripción
1	Testigo 1	Sustrato (suelo + m.o humus al 10 %)
2	T 1+Agrotóxico	Sustrato (suelo + m.o humus al 10 %) + Ametrina
3	Testigo 2	Sustrato-Seto (vitroplanta)
4	T 2+Agrotóxico	Sustrato-Seto (vitroplanta) + Ametrina
5	Tratamiento 1	Sustrato-Seto-MVA (<i>Rhizophagus</i> intrarradices)
6	Tt 1+ Agrotóxico	Sustrato-Seto-MVA(<i>Rhizophagus</i> intrarradices)+ Ametrina
7	Tratamiento 2	Sustrato-Seto-MVA (<i>Fummeliformis mosseae</i>)
8	Tt 2 + Agrotóxico	Sustrato-Seto-MVA (<i>Fummeliformis mosseae</i>) + Ametrina
9	Tratamiento 3	Sustrato-Seto-MVA (<i>Glomus. fasciculatum</i>)
10	Tt 3 + Agrotóxico	Sustrato-Seto-MVA (<i>Glomus. fasciculatum</i>) + Ametrina

El Agrotóxico utilizado fue el herbicida derivado de las Triazinas, de nombre comercial Gesapax PH 80, y principio activo Ametrina, de la firma Syngenta Crop Protection AG, Suiza, que se recomienda en cultivos de banano y caña de azúcar en aplicación pre y post emergente contra malezas anuales mono y dicotiledóneas a una dosis entre 1.6 a 2.4 kg i.a. /há [27].

En cada variante experimental se evaluaron 10 vitro plantas a las que se aplicó por única vez la dosis máxima del producto correspondiente a 6000 mg ia/L (6000 ppm). Por vitro planta se incorporó por irrigación 100 ml de la suspensión en agua, que representa 600 mg de i.a., en

correspondencia con la dosis del producto por ha. La aplicación se realizó el mismo día de forma fraccionada para evitar la percolación del producto.

Cada 24 horas durante una semana, se efectuó el riego de las vitro plantas, y se colectó en frascos volumétricos aforados de 500 ml previamente rotulados, el lixiviado acumulado obtenido de las 10 vitro planta de cada variante. Cada eluato se enrazó, y procedió a su conservación en refrigeración hasta la ejecución de los bioensayos. A los 7 días se procedió a la realización de los bioensayos en las plantas indicadoras.

Previo a la realización de los bioensayos fitotoxicológicos, fue preciso obtener una curva de calibración (C: concentración vs.Efp efecto probit), dada por la ecuación de regresión probit [28]. Para obtener esta curva, se estableció un rango de concentración de ametrina, con una respuesta lineal sobre el modelo biológico o bioindicador utilizado. Para ello, se eligieron en la curva puntos extremos de máximo y nulo efecto, y puntos intercalados. El rango de concentración utilizado fue de 50 a 500 mg ia/L (ppm) Estas curvas se obtuvieron para cada modelo biológico empleado como bioindicador de fitotoxicidad.

En el caso que ocupa a esta investigación, se utilizaron dos modelos biológicos, pertenecientes a especies botánicas de alta sensibilidad; una monocotiledónea, maíz (*Zea mays*) variedad Canilla y una dicotiledónea, lechuga (*Lactuca sativa*) variedad Black Simpson; que permitieron evaluar el efecto residual del herbicida, por ser el producto utilizado en pre y post emergencia contra arvenses monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Para evaluar las variantes de ensayo con los diferentes tratamientos acorde al diseño experimental, para cada cultivo (banano y caña de azúcar), por cada variante, y modelo biológico, se montaron cinco magendas plásticas de 10 cm de diámetro y volumen de 250 ml.

En cada recipiente conteniendo el mismo sustrato utilizado para la adaptación de las vitro plantas, se colocaron para cada bioindicador por separado, 10 semillas.

A las 24 horas de depositadas las semillas, se efectuó una primera aplicación de los eluatos colectados anteriormente conteniendo el lixiviado residual de ametrina de cada variante de ensayo. En cada uno de los recipientes se incorporó 50 ml del eluato sin que ocurra percolación. A las 48 horas se realizó la segunda aplicación del eluato. Con posterioridad, se procedió a un riego diario con agua hasta observarse el 100 % de germinación de las semillas en las Variantes Testigo.

El Efecto fitotóxico en cada variante experimental se realizó según los principios básicos y fundamentos referidos por Simón [1]. Con el empleo de la Escala de Ecotoxicidad que se aplica para el caso particular de herbicidas [27]. Con el empleo de esta Escala, y la curva de calibración o en su lugar directamente la ecuación de regresión probit obtenidas previamente para cada modelo biológico, se estimaron las concentraciones probit causantes de dichos efectos.

Para evaluar la capacidad fitorremediadora del sistema en condiciones de semicampo durante la fase de alistamiento y posterior al trasplante en campo, en la unidad experimental correspondiente a una canaleta de asbesto cemento de 12 m de largo por metro de ancho, se

trasplantaron las vitro plantas micorrizadas de la variante (especie MVA), que mostró mejor capacidad fitorremediadora en los resultados de los bioensayos a las 14 semanas de adaptación.

La siembra se realizó según las normas técnicas establecidas para vitro plantas de banano de 4000 vitro plantas/há a un marco de plantación de 1.2 m x 3.0 m. A los 7 días del trasplante, luego de superar el stress que sufrieron, se procedió a realizar el tratamiento del agrotóxico a la dosis máxima establecida con el empleo de un aspersor manual de 5 litros de capacidad y boquilla de abanico propia para herbicidas [27].

Posterior a la aplicación del producto, se colectaron por separado a los (7,14, 21 y 30 días) y profundidad de hasta 30 cm, muestras de suelo, donde fue aplicado el herbicida, procediéndose a realizar las evaluaciones a través de los bioensayos fitotóxicológicos descritos; lo que permitió la estimación de los residuos persistentes del agrotóxico en el suelo y de este modo evaluar la capacidad fitorremediadora del sistema suelo-vitro planta- simbiote micorizosférico MVA

Para ello, a las magendas utilizadas en los bioensayos, se depositaron 250 g de suelo tomados de entre las vitro plantas de las canaletas, o del campo, y directamente se depositaron las 10 semillas de las plantas bioindicadoras de fitotoxicidad utilizadas (lechuga y maíz), procediéndose a su evaluación y estimación del efecto fitotóxico producido por los residuos del herbicida que aún persisten. Con el efecto eco tóxicos estimados y la ecuación de regresión (concentración-efecto), acorde con el procedimiento de cálculo según el método probit [28], con el auxilio de un sistema para microprocesador computarizado, fue posible establecer los niveles de residuos en la variante de ensayo y establecer de acuerdo a estos resultados el riesgo actual o potencial que representan.

Resultados y Discusión

Los endófitos aislados, fueron caracterizados tomando en cuenta criterios de expertos del Instituto de Ecología y Sistemática de la Academia de Ciencias de Cuba, para su clasificación sistemática, así como las características de las esporas de resistencia reaisladas y la anatomía de la infección interna MVA en el corte radicular, confirmándose de este modo que se tratan de especies acorde con las descripciones taxonómicas realizadas [22,29]; coincidiendo en muchos aspectos con gran aproximación con las especies *Glomus fasciculatum*, *Fummeliformis mussae* y *Rhizophagus intraradices* por sus hifas no excesivamente gruesas, infección vesicular densa, ocupando prácticamente todo el córtex radicular y las vesículas intercelulares grandes, de forma ovalada, generalmente univacuoladas, de pared gruesa.

Estas descripciones confirman su identidad según describe Khasa et al. (2014) [31], en el catálogo de las principales especies de MVA. Al cabo de las 14 semanas de inoculadas las vitro plantas, la evaluación de la capacidad infectiva y el porcentaje de micorrización tal como se muestra en la Tabla 2, se obtuvo que la micorrización osciló con una capacidad infectiva entre 50 – 80 cuerpos fructíferos (cf)/cm² de raíz y en grado de micorrización entre un 30-77 %, dependiendo de las especies de MVA.

En esta oportunidad *R. intrarradices* mostró los mejores resultados al lograr alta micorrización con menos capacidad infectiva, seguido por *G. fasciculatum* con ligeras diferencias respecto a la primera, y ambas con diferencias significativas respecto a *F. mosseae* que fue la menos infectiva.

De la propia Tabla 2, se corrobora los resultados de quienes refieren un excelente comportamiento infestivo de las especies *R. intrarradices* y *G. fasciculatum* [22, 29,30]. Estos propios autores aducen cierta versatilidad de ambas, en particular en los cultivo de raíces y tubérculos; también hay reportes por otros autores [30,32], del amplio rango de hospedantes de ambas especies de MVA; sin embargo, el comportamiento de *F. mosseae* que resultó la menos infectiva en esta investigación, es tenida en cuenta como una de las mejores en todas las Musaseas. Hay que tener en cuenta que son muchos los factores edáficos que influyen en el comportamiento de las MVA, por lo que es muy controvertido tratar de generalizar su comportamiento.

Se comprobó en esta investigación los beneficios del efecto de la micorrización sobre el crecimiento y desarrollo vegetativo de las vitro plantas de banano en fase de adaptación, resultando *R. intrarradices* y *G. fasciculatum* las que más estimularon el crecimiento y desarrollo vegetativo alcanzado por las plántulas, lo que demuestra categóricamente que las vitro plantas se beneficiaron con las micorrizas visto a través de los parámetros indicadores de crecimiento y desarrollo evaluados, cuyos resultados se muestra en la Tabla 3. Evidentemente, en todos los casos las vitro plantas micorrizadas en cualquiera de sus variantes, superaron al Testigo 2, correspondiente al sistema sustrato-vitro plantas sin micorrizar.

Tabla 2.- Resultados obtenidos de la micorrización de vitro plantas de banano clon 0630 en fase de adaptación a las 14 semanas de inoculadas por separado con tres endófitos MVA seleccionados al 5% de significación.

No.	Variantes	Potencial de inoculo (pi: cf/cm ² de raíz)	Grado de micorrización (gm %)	Capacidad infectiva (ci)=gm/pi
1	<i>R.</i> intrarradices	50 a	77 a	1.54 a
2	<i>F. mosseae</i>	80 c	30 c	0.38 c
3	<i>G.</i> <i>fasciculatum</i>	70 b	70 ab	1.00 b

Cf: cuerpos fructíferos Ci: Baja <1>Alta según Abbott y Robson (2002),

Estos elementos, hasta el presente desconocidos, son de vital importancia productiva porque la micorrización logra acelerar el crecimiento y desarrollo de las vitro plantas lo que permite su alistamiento para su posterior trasplante al campo en menor tiempo, estimado en 21 días respecto a las plantas que no micorrizadas, pero además hay una evidente mayor calidad visto a través de los parámetros mostrados en la Tabla 3 y en elementos culitativos como coloración, vigor, turgencia y resistencia al estrés hídrico, cosa esta muy importante al tratarse de medios de adaptación a los cambios climáticos.

Tabla 3.- Resultados obtenidos de parámetros indicadores del crecimiento y desarrollo de vitro plantas de banano clon 0630 micorrizadas en fase de adaptación a las 14 semanas de

inoculadas por separado con tres endófitos MVA seleccionados del género *Glomus* al 5 % de significación.

No.	Variantes	Porte (cm)	Diámetro (cm)	Hojas (número)	Raíces
1	<i>Rs intrarradices</i>	31.1a	1.9 ^a	7 ^a	9 ^a
2	<i>F mosseae</i>	23.6b	1.6b	6 ^a	6b
3	<i>G. fasciculatum</i>	27.3b	1.7b	7 ^a	7b
4	Testigo	20.7d	1.1c	5ab	5b

Bioensayos de Ecofitotoxicidad con vitro plantas en adaptación y alistamiento.

Como premisa para la realización de estos ensayos de ecofitotoxicidad, fue establecer las curvas de calibración para ambas especies botánicas escogidas como plantas bioindicadoras de ecotoxicidad [3,6]. De estos resultados registrados en la Tabla 4, se evidencia mayor tolerancia del maíz al herbicida ensayado, respecto a la lechuga, lo cual coincide con los reportes de los precursores de esta familia de herbicidas que son las Triazinas [27], las cuales permiten su aplicación en preemergencia en este cultivo. El comportamiento lineal en el rango de concentración ensayado, es una garantía de la validez del método con fines de evaluar la fitotoxicidad de la ametrina en suelos contaminados a través de bioensayos con estas especies como bioindicadores de ecofitotoxicidad.

Tabla 4.- Resultados relacionados con la obtención de las curvas de calibración (C: concentración vs. Efp efecto probit), correspondiente a la Ametrina para ambas especies bioindicadoras.

Concentración Ametrina (ia) mg/l (ppm)	log C	Efecto fitotóxico Probit (%) en plantas bioindicadoras	
		Maíz	Lechuga
50	1.7	10	15
100	2.0	20	25
200	2.3	35	40
300	2.5	45	55
400	2.6	60	75
500	2.7	70	90

Los resultados obtenidos de los bioensayos ecofitotoxicológicos con las vitro plantas de banano micorrizadas con cada uno de los endófitos MVA por separado en fase de alistamiento presentados en la Tabla 5, muestran al cabo de 7 días de realizada la aplicación de la ametrina por irrigación, demuestran, -aún con el poco desarrollo de estas plántulas que las hacen muy susceptibles-, la capacidad fitorremediadora de este sistema ante la acción fitotóxica de la ametrina, aplicada a una concentración de 6000 mg/l de i.a./há.

Estos resultados paradójicamente muestran que no existe total correlación con la capacidad infectiva y el grado de micorrización en el córtex radicular respecto a la capacidad fitorremediadora del sistema, lo que es una evidencia del grado de especificidad que tiene lugar

micorrizas-plantas; sobre este particular no hay evidencias en la literatura científica consultada acerca de la explicación de este fenómeno salvo algunas explicaciones desde el punto de vista bioquímico de las interacciones plantas-simbiontes rizosféricos expuestos [3].

Tal como muestra la Tabla 5, la especie *R. intrarradices*. de gran capacidad infectiva y alto grado de micorrización con un 77 % del cortex radicular (Tabla 2), las vitro plantas, que recibieron tratamiento con el agrotóxico, mostraron capacidad fitorremediadora inferior a *G. fasciculatum*; al sólo biodegradar el 14.2 % del producto, con valores de fitotoxicidad del 70 % en el maíz y 90 % en la lechuga, y observarse en las magendas correspondientes a esta variante del bioensayo, semillas no germinadas, que observadas bajo estereoscopio se encontraban necrosadas, lo que provocó al cabo de los 14 días del ensayo, clorosis y necrosis del 90 % de las vitro plantas que no se recuperaron y las condujo inevitablemente a la muerte.

Tabla 5.- Resultados de bioensayos fitotxicológicos en vitroplantas en fase de adaptación a los 7 días del tratamiento con Ametrina (6000 mg/L).

No.	Variantes	Bioensayo ecotóxico en Maíz			Bioensayo ecotóxico en Lechuga		
		Eftox	log C	C (ppm) Probit	Eftox	log C	C (ppm) Probit
1	Testigo 1	91	2.78	600	99	2.78	600
2	Testigo 2	89	2.77	590	97	2.77	590
3	Tratamiento 1	70	2.71	515	90	2.71	515
4	Tratamiento 2	80	2.76	575	95	2.76	575
5	Tratamiento 3	65	2.67	470	80	2.67	470

La variante correspondiente a la especie *G. fasciculatum* con sólo el 70 % de grado de micorrización, mostro una capacidad fitorremediadora del 21.7 %, que permitió no rebasar valores de fitotoxicidad del 65 % en maíz, y del 80 % en lechuga, con sólo el 30 % de semillas sin germinar e igual porcentaje de plántulas deformadas, achaparradas y cloróticas. En este caso, las vitro plantas lograron una recuperación del 71 % y sobrevivir ante el efecto fitotóxico del herbicida. La especie *F. mosseae* mostró los resultados más bajos, con sólo un 4.2 % de capacidad fitorremediadora y fitotoxicidad del 80 % en maíz y 95 % en lechuga. En este caso, las vitro plantas afectadas no se logró sobre vivencia.

De la Tabla 6, se demuestra para *G. fasciculatum* un menor impacto del agrotóxico sobre la capacidad infectiva y de micorrización respecto a las dos restantes MVA evaluadas, lo que es lógico, teniendo en cuenta su mayor capacidad fitorremediadora que le permite enfrentar la acción adversa que provoca el agrotóxico. Por ello, antes de micorrizar no deben realizarse tratamientos de fertilización química, ni la aplicación de herbicidas hasta tanto estas especies logren colonizar las raíces de las plantas cultivadas; criterios coincidentes con Ferrer et al. (2007) [36], y con Howeler et al. (2014) [37].

De los resultados de estos bioensayos recopilados en las Tablas 5 y 6, se determinó, que a pesar de la escasa diferencia entre las especies *R. intrarradices* y *G. fasciculatum*, a los efectos de los objetivos de la investigación, el mejor comportamiento integral lo mostró esta última especie, que además de una adecuada capacidad infectiva y grado de micorrización, fue la única especie de las tres ensayadas que mostró capacidad fitorremediadora de interés; razón suficiente para concebir la inclusión de esta especie en la extensión de esta investigación a la fase de campo.

Tabla 6.- Resultados obtenidos de la micorrización de vitroplantas de plátano clon 0630 en fase de adaptación a las 14 semanas de inoculadas por separado con tres endófitos MVA seleccionados del género *Glomus* comparadas con variantes tratadas con el agrotóxico ametrina al 5 % de significación.

No.	Variantes	Potencial de inoculo (Gi:cf/cm ² de raíz)	Grado de Micorrización (GM %)	Capacidad infectiva Ci = GM/Pi
1	TT 1: <i>rhizophagus</i> intrarradices	50 ^a	77 ^a	1.54 ^a
2	TT 1 + Agrotóxico	71b	51d	0.72c
3	TT2: <i>fummeliformis mosseae</i>	80d	30e	0.38d
4	TT 2 + Agrotóxico	90e	23f	0.26de
5	TT3: <i>G. fasciculatum</i>	70b	70b	1.00b
6	TT 3 + Agrotóxico	76bc	63bc	0.83bc

Cf: cuerpos fructíferos Ci: Baja <1>Alta según Abbott y Robson (2002)

Bioensayos con vitro plantas alistadas en campo.

Los resultados de los bioensayos en esta fase, mostrados en la Tabla 7, corroboran los resultados previos de la fase de alistamiento, reproduciéndose una buena capacidad fitorremediadora, de *G. fasciculatum* en la fase de extensión en campo, lo que se evidenció por el desarrollo alcanzado por las vitro plantas y el grado de micorrización al cierre del experimento, que permitió la biodegradación del 38.4. % del agrotóxico residual en el suelo, con tan sólo un efecto ecotóxico de un 55 % en maíz y un 65 % en lechuga, al registrarse sólo el 30 % de semillas sin germinar e igual porcentaje de posturas cloróticas o necrosadas.

En campo los resultados duplicaron el efecto fitoremediador del sistema logrando biodegradar el 90% del agrotóxico en un plazo de 60 días.

No.	Variantes	Bioensayo en Maíz			Bioensayo en Lechuga		
		Eftox	log C	C (ppm)	Eftox	log C	C (ppm)
1	Suelo-humus 10 %	89	2.77	590	97	2.77	590
2	Suelo-vitro planta	80	2.76	575	95	2.76	575
3	Suelo-Vitro planta- MVA (<i>G. fasciculatum</i>)	55	2.57	370	65	2.57	370

Cuadro 6.- Resultados de los bioensayos ecotoxicológicos in vitro plantas en fase de alistamiento a los 31 días del tratamiento con el agrotóxico Ametrina

En esta oportunidad el 80 % de las vitro plantas lograron recuperarse totalmente de la fitotoxicidad provocada por el herbicida y alcanzaron un crecimiento y desarrollo normal.

Estos resultados que por vez primera se reportan, tienen trascendental importancia, al demostrarse una vía agroecológica para la integración de la lucha química y el medio ambiente en el contexto del control de plagas, en el caso particular con el empleo de herbicidas residuales de amplio espectro. En principio, esta nueva tecnología permitirá aprovechar las bondades de los agrotóxicos, aún insustituibles, y una vez desplegada su acción, propiciar su biodegradación acelerada y lograr descontaminar el suelo y el medio ambiente en general.

Consideraciones

Desde el punto de vista propio, coincidentes con otros autores [12-15], la elección de métodos de bioensayos como una alternativa viable, económicamente factible y científicamente probada, sin pretensión del remplazo de los métodos analíticos instrumentales, permitieron la conducción práctica de esta investigación, lográndose dos objetivos: disponer de bioindicadores de ecotoxicidad en suelos contaminados con agrotóxicos y demostrar la capacidad de un sistema fitoremediador de contaminación de los suelos con elementos presentes en el propio suelo.

Es evidente, que esta tecnología, aunque su diseño no estuvo encausado como un aporte económico, indirectamente reporta beneficios económicos manifiestos no cuantificados, ya que el aporte probado de las micorrizas, en lo que representan a la nutrición, crecimiento y desarrollo vegetativo de las vitro plantas y su resistencia a la sequía o estrés hídrico; así como fitosanitario sobre determinadas plagas cuyo hábitat es el suelo, como hongos fitopatógenos y nemátodos tiene implicación económica de consideración; sin embargo, los beneficios sociales y ambientales corroborados en los sitios donde se llevó a cabo la extensión de esta innovación, corroboran la efectividad fitoremediadora del sistema "hongo endófito nativo MVA-seto-simbionte rizosférico.

Conclusiones

Las tres especies de micorrizas lograron infestar las vitro plantas con diferentes grados de micorrización, resultando *Rhizophagus intrarradices* con mayor capacidad infestiva (CI) de 1.54 seguida por *Glomus fasciculatum* con 1.00 y *Fummeliformis mosseae* con 0,38. Estimulando el desarrollo y crecimiento vegetativo de las vitro plantas.

La especie *Glomus fasciculatum* a pesar de tener menor capacidad infectiva que *Rhizophagus intrarradices*, mostró mayor capacidad fitoremediadora de 21.7 %, que permitió no rebasar valores de fitotoxicidad del 65 % seguido por *Rhizophagus intrarradices* con 14.2 % y *Fummeliformis mosseae* 4,2 %. La extensión en campo utilizando la especie *Glomus fasciculatum* como mejor variante integral, logró a los 30 días la biodegradación del 38,4 % del agrotóxico residual con tan solo un efecto ecotóxico de 55 % en maíz y un 65% en lechuga.

Futuras líneas de investigación

Se trabaja en las búsquedas de combinaciones de simbioses rizosféricas más eficientes en cuanto a la capacidad fitoremediadora de suelos contaminados que permitan minimizar el impacto de agroquímicos y agrotóxicos después de que estos han sido aplicados y aprovechado las bondades manifiestas de la fertilización y protección de los cultivos de modo que se logre la sostenibilidad de los agroecosistemas agrícolas y el reciclaje de residuos contaminantes y su conversión en compuestos asimilables por las plantas y microorganismos.

Basados en los principios de la Fitoremediación, se trabaja actualmente en un nuevo Proyecto relacionado con el uso Seguro y Eficaz de Agrotóxicos, en particular de Herbicidas, donde se aprovechan la capacidad de estos productos en el control de arvenses indeseables y a la vez las propias plantas beneficiarias se convierten en sistemas fitoremediadores de los suelos

ante la presencia residual de estos continentes; de este modo las plantas de cultivo se benefician del efecto controlador de malezas del herbicidas, pero a su vez liberan al suelo del contaminante.

Estas experiencias se llevan a cabo con vitro platas obtenidas del cultivo in vitro de tejidos por biotecnología a las que desde un inicio durante las fase de adaptación y enraizamiento se inoculan con los simbiontes rizosféricos MVA y bacterias quimio surfactantes.

Bibliografía

- Simón, F.A. 2010a. Agroecotoxicología. Métodos de Bioensayos ecotoxicológicos. Editorial Ciencia y Técnica ACC Cuba: 143p. ISBN: 978-959-207-389-0 Obra Protegida Registro Propiedad intelectual del Instituto cubano del Libro Cenda, Cuba 554-23022010
- Simón, F.A. 2010b. Agrobiotecnología y Fitosanidad. Editorial Ciencia y Técnica ACC Cuba: 143p. ISBN: 978-959-207-389-0 Obra Protegida Registro Propiedad intelectual del Instituto cubano del Libro CENDA, Cuba 551-23022010
- Simón, F.A. 2010c. Filtros Ecológicos: Biotecnología de Fitoremediación. Editorial Ciencia y Técnica ACC Cuba: 143p. ISBN: 978-959-207-389-0 Obra Protegida Registro Propiedad intelectual del Instituto cubano del Libro CENDA, Cuba 553-23022010
- Simón, F.A. 2000. Contribución al estudio de Impacto de Plaguicidas y sus residuos en Agroecosistemas de montaña en Cuba. __ Cuba: Universidad Central de Las Villas, 2000.__ Tesis Doctoral en Ciencias Agrícolas.
- Simón, F.A. y Mayet, R. 2015. Cultivos “in vitro” bioindicador ecotoxicológico Tesis en opción al grado de Master en Biotecnología Mención Ambiental. Universidad de Oriente, Cuba
- Simón, F.A y Mayet, R. 2016. Cultivos in vitro de banano como bioindicador-fitoremediador de la contaminación de suelos con agrotóxicos Publicado en http://sites/fcv.espol.edu.ec/filesarchivos_frcv/Guia%30resumen%20bio202016pdf En Prensa Revista institucional de la Espol Focus Edición Especial No. 72 (2017)
- Dickinson, M. B.; J. C. Dickinson and F. E. Putz. Natural forest management as a conservation tool in the tropics: divergent views on possibilities and alternatives. *Commonwealth Forestry Rev.* 81(9): 109-115, 2002.
- Parren, M. P. and N. R. De Graaf. The quest for natural forest management in Ghana.__ the Netherlands: Tropenbos Foundation, 2005.__ 199 p.__ (Tropenbos Series; 13)
- Jabaji-Hare, S. H. and W. B. Kendrick. Effects of pesticide on root exudation and on composition of extracts of mycorrhizal and nonmycorrhizal leek roots. *Can. J. Plant Pathol.* 27: 18-26, 2005.
- Laszlo, P. Las Arcillas en Química orgánica. *Mundo Científico (España)* 102: 552-561, 2010.

- Salt D.E., Smith R.D., Raskin I., 1998. 'Phytoremediation'. Annual Review of Plant Physiology 49, 643-668.
- Becerril J.M., Barrutia O., García-Plazaola J.I., Hernández A., Olano J.M., Garbisu C., 2007. Especies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación'. Ecosistemas 2007/2, 51-56.
- Bernal, M.P., Clemente, R., Vazquez, S. y D.J. Walker. 2007. Aplicación de la fitorremediación a los suelos contaminados por metales pesados en Aznalcóllar. Ecosistemas 16 (2): <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=483>
- Aronson, J., Ovalle, C., Avendaño, J., Longeri, L., y Del Pozo, A., 2002. Agroforestry tree selection in central Chile: biological nitrogen fixation and plant growth in six dryland species. Agrofor. Syst. 56: 155-166.
- Renison, D., Cingolani, A.M., Suarez, R., Menoyo, E., Coutsiers, C., Sobral, A., y Hensen, I., 2005. The restoration of degraded mountain forests: effects of seed provenance and microsite characteristics on *Polylepis australis* seedling survival and growth in Central Argentina. Restor. Ecol. 13:129-135.
- Renison, D., Hensen, I., Suarez, R., y Cingolani, A.M., 2006. Cover and growth habit of *Polylepis* woodlands and shrublands in the mountains of central Argentina: human or environmental influence? J. Biogeogr. 33:876-887.
- Mentis, M.T., 2006. Restoring native grassland on land disturbed by coal mining on the Eastern Highveld of South Africa. South African J. Sci. 102:193-197.
- Milton, S.J., Aronson, J., y Blignaut, J.N., 2005. Restoring natural capital – shared visions for ecology and economy. Quest (South African Academy of Science) 2:39-41.
- Dierksmeier, G. Plaguicidas, residuos y presencia en el Medio. __ Cuba: Universidad Central de Las Villas, 1996. __ Tesis Doctoral en Ciencias Agrícolas.
- Camprubi A., Calvet C., Esta un V. y J. Pera. 1987. Aislamiento de un hongo formador de micorrizas vesiculo-arbusculares y ensayo de su efectividad en Crisantemo y Fresa. Invest. Agr.: Prod. & Prot. Veg. 2(3): 281-294.
- Furlan, V. and J. A. Fortin. 1975. A flotation-bubbling system for collecting Endogonaceae spores from sieved soil. Naturaliste Can. 102: 663-667
- Abbott, L. K. and A. D. Robson. 1979. A quantitative study of the spores and anatomy of mycorrhizas formed by a species of *Glomus*, with reference to its taxonomy. Aust. J. Bot., 27: 363-375, 1979
- Mercadé, M. E. 1996. Screening and selection of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. Joun. Appl. Bacteriolog. 81: 161-166.

- Matsuyama, T.; M. Sugawa e I. Yano. 1997. Direct colony thin-layer chromatography and rapid characterization of *Pseudomonas aeruginosa* mutant defective in production of wetting agents. *Appli. Environmental Microbial.* 63: 1286-1297.
- Mulligan, C. N.; D. Cooper and R. J. Newfield. Selection of microbes producing biosurfactant in medio without hidrocarbons. *Joun. Ferment. Technol.* 75: 311-317, 1997.
- Pérez, J. C. y C. Leguizamón. 1998. Interacciones entre micorrizas nativas, *Pseudomonas* spp. Fluorescentes y calcio, en el manejo de *Fusarium* spp. En espárragos. *Cenicafé* 49(3): 211-233.
- Gesapax PH 80 (amaetrina) 2010. Syngenta Crop Protection AG, Suiza
- Samuels, M. L. and Freese, F. 2008. *Statistics for the life sciences.*__ San Francisco: Dellen Publishing Company, 3er ed. 597p.
- Collins, Nancy; and F. L. Pflieger. *Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae and Cultural Stresses.*__ Minn: Am. Soc. Agr. Univ. Minnesota, 2012.__ p. 71-99.__ (Special Publication; 64)
- Bernal, M.P., Clemente, R., Vazquez, S. y D.J. Walker. 2007. Aplicación de la fitorremediación a los suelos contaminados por metales pesados en Aznalcóllar. *Ecosistemas* 16 (2): <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=483>
- Aronson, J., Ovalle, C., Avendaño, J., Longeri, L., y Del Pozo, A., 2002. Agroforestry tree selection in central Chile: biological nitrogen fixation and plant growth in six dryland species. *Agrofor. Syst.* 56: 155-166.
- Renison, D., Cingolani, A.M., Suarez, R., Menoyo, E., Coutsiere, C., Sobral, A., y Hensen, I., 2005. The restoration of degraded mountain forests: effects of seed provenance and microsite characteristics on *Polylepis australis* seedling survival and growth in Central Argentina. *Restor. Ecol.* 13:129-135.
- Mentis, M.T., 2006. Restoring native grassland on land disturbed by coal mining on the Eastern Highveld of South Africa. *South African J. Sci.* 102:193-197.
- Milton, S.J., Aronson, J., y Blignaut, J.N., 2005. Restoring natural capital – shared visions for ecology and economy. *Quest (South African Academy of Science)* 2:39-41.