

**GLOMALINA (GRSP) COMO CAPTADOR DE METALES PESADOS (Cd Y Hg)  
EN SUELOS IMPACTADOS**

**CAROLINA ESTEBAN CIFUENTES**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2015**

**GLOMALINA (GRSP) COMO CAPTADOR DE METALES PESADOS (Cd Y Hg)  
EN SUELOS IMPACTADOS**

**CAROLINA ESTEBAN CIFUENTES**

**Tesis presentada como requisito para otorgar el título de Magíster en  
Química**

**Directores**

**PhD. BEATRIZ ELENA GUERRA**

**Doctora**

**MSc. JOSÉ CARLOS GUTIÉRREZ**

**Magíster en Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**

**BUCARAMANGA**

**2015**

A mí esposo, por su amor, su paciencia y por llenarme de fortaleza  
A mis hijas por ser mi más grande motivación  
A todos aquellos que confiaron en mí  
... que sabían que este día llegaría

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Doctora Beatriz Elena Guerra porque sin ella esta investigación no hubiese sido posible, por abrirme las puertas de su grupo de investigación, por dirigir este proyecto, por la gestión para conseguir los recursos y por sus enseñanzas no solo para la academia sino para la vida.

A José Carlos Gutiérrez por su confianza, su dirección, su apoyo que fue muy valioso para poder culminar esta etapa y por sus consejos los cuales me ayudaron a seguir adelante y no desistir.

A la Universidad de Santander (UDES) y a la empresa minera AUX por el aporte económico para esta investigación.

A los doctores Martha Daza y Herminul Cano por sus aportes y la evaluación de este proyecto.

A las Profesoras Rosa Claudia López y Yolanda Vargas por su colaboración en el desarrollo experimental de esta investigación.

A la Doctora Clara Gonzales y a Martha Díaz del laboratorio de Inmunología UIS, por permitirme capacitarme en su laboratorio y realizar la SDS-PAGE.

A mi esposo por su apoyo incondicional, por ser el bastoncito que me sostuvo en los momentos difíciles, por su amor y por hacer parte de mi vida. A mis hijas porque son la fuerza que me impulsa a superarme cada día.

A mi familia, principalmente a mi madre y mis tías, por sus oraciones.

A mis compañeras del LIIBAAM, en especial a Julie por sus enseñanzas, a Adriana, Laury y Catalina por su colaboración.

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ARS	Agricultural Research Service
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades)
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumina de suero bovino)
Cd	Cadmio
EPA	Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental)
GRSP	Glomalin related soil protein (Glomalina asociada a las proteínas del suelo)
Hg	Mercurio
HMA	Hongos micorrízicos arbusculares
HPLC	High performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protones
Hsp60	Proteína de choque térmico 60
LIIBAAM	Laboratorio de Innovación e investigación en Biotecnología Agroambiental
pH	Potencial de Hidrógeno
ppm	partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SAG	Servicio agrícola y ganadero
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio)
SNC	Sistema Nervioso Central
UCLM	Universidad de Castilla-La Mancha

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN	18
1. MARCO TEÓRICO Y DE ANTECEDENTES	20
1.1 COMPOSICIÓN DEL SUELO	21
1.1.1 Metales pesados en el suelo	22
1.2 MERCURIO	23
1.2.1 Suelos contaminados con mercurio	24
1.2.2 Efectos del mercurio en la salud	27
1.2.3 Niveles de mercurio permitidos	29
1.3 CADMIO	31
1.3.1 Suelos contaminados con cadmio	32
1.3.2 Efectos del cadmio en la salud	34
1.3.3 Niveles de cadmio permitidos	35
1.4 BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS	36
1.5 CAPTACIÓN DE METALES PESADOS POR PROTEÍNAS	38
1.6 PROTEÍNAS DEL SUELO	40
1.7 GLOMALINA	41
1.7.1 Uso de la glomalina como captador de metales	43
1.7.2 Estudio de la estructura de la glomalina	44
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	48
2.1 ETAPA 1: PRODUCCIÓN DE GLOMALINA (GRSP) POR LOS HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES	48
2.1.1 Cultivos monospóricos de <i>Glomus</i> spp	49

2.1.2 Cuantificación de Microorganismos rizosfericos	51
2.1.3 Extracción y determinación de GRSP	52
2.2 ETAPA 2: TOLERANCIA DE LOS HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES A LOS METALES PESADOS CD Y HG Y CAPTACIÓN DE LOS METALES PESADOS POR LA GLOMALINA	53
2.2.1 Contaminación controlada de los suelos	53
2.2.2 Conteo de esporas	56
2.2.3 Contenido de glomalina total	56
2.2.4 Cuantificación de GRSP-Metal (Metal unido a la glomalina)	56
2.2.5 Determinación del contenido de mercurio	56
2.2.6 Determinación del contenido de cadmio	57
2.3 ETAPA 3: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIORREMEDIADORA DE LA GLOMALINA EN SUELOS IMPACTADOS	57
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES	59
3.1 CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS	59
3.2 PRODUCCIÓN DE GLOMALINA (GRSP) POR LOS HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES	60
3.3 RELACIÓN ENTRE NÚMERO DE ESPORAS Y EL CONTENIDO DE GLOMALINA TOTAL	61
3.4 CAPTACIÓN DE METALES PESADOS POR LA GLOMALINA	62
3.4.1 Estudio de la captación de mercurio	62
3.4.2 Estudio de la captación de cadmio	67
3.5 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIORREMEDIADORA DE LA GLOMALINA EN SUELOS IMPACTADOS	72
3.5.1 Análisis fisicoquímico de los suelos afectados	75
3.5.2 Residuos aminoacidicos posibles captadores de Cd y Hg	76
4. CONCLUSIONES	79
5. RECOMENDACIONES	81
BIBLIOGRAFÍA	83
ANEXOS	92

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Composición porcentual del suelo.	21
Figura 2. El mercurio.	24
Figura 3. Equilibrio entre las especies del mercurio.	24
Figura 4. Transformaciones biológicas y químicas del mercurio en el suelo.	26
Figura 5. Ciclo biogeoquímico de mercurio.	27
Figura 6. El cadmio.	32
Figura 7. Ciclo biogeoquímico del cadmio.	33
Figura 8. Fuentes de contaminación de cadmio.	34
Figura 9. Unión del metal a los grupos amino y carboxilo de la proteína	38
Figura 10. Complejo formado por la unión de metales pesados a grupos –SH de proteínas.	38
Figura 11. Incorporación de mercurio en medio de puentes disulfuro.	39
Figura 12. Enzimas en el suelo.	40
Figura 13. La glomalina en una raíz de maíz.	43
Figura 14. <sup>1</sup> H-RMN de la glomalina purificada usando las columnas de fenil y lectina, deglicosilada y separando la fracción de oligosacáridos (a) y de proteína (b).	45
Figura 15. Análisis del extracto de GRSP por SDS-PAGE. Gel teñido con plata coloidal.	46
Figura 16. Pirolisis de ionización en campo- Espectroscopia de masas	46
Figura 17. Cultivos monospóricos de <i>Glomus</i> spp.	49
Figura 18. Germinador con <i>Brachiaria decumbens</i> de una semana de germinación y desarrollo	49

Figura 19. Inoculación de <i>Brachiaria decumbens</i> con esporas de <i>Glomus</i> spp.	51
Figura 20. Proceso para realizar el conteo de esporas	52
Figura 21. Metodología de contaminación controlada de suelos y evaluación de la captación de Cd por la glomalina	54
Figura 22. Metodología de contaminación controlada de suelos y evaluación de la captación de Hg por la glomalina	54
Figura 23. Ensayos en suelo artificial de tolerancia de las micorrizas a los metales pesados	55
Figura 24. Molienda y tamizaje de suelos	58
Figura 25. Procedimiento para extracción y cuantificación de GRSP	60
Figura 26. Relación entre el número de esporas y el contenido de glomalina total	61
Figura 27. Variación de la esporulación en presencia de mercurio.	63
Figura 28. Glomalina precipitada mediante tratamiento con HCl 0,1M	64
Figura 29. Producción de la glomalina en presencia de mercurio.	65
Figura 30. Porcentaje de captación de mercurio por la glomalina	66
Figura 31. Captación de mercurio por la glomalina	67
Figura 32. Variación de la esporulación en presencia de cadmio.	69
Figura 33. Producción de la glomalina en presencia de cadmio	70
Figura 34. Porcentaje de captación de cadmio por la glomalina	71
Figura 35. Captación de cadmio por la glomalina	72
Figura 36. Vichacha <i>Vaccinium meridionale</i> )	73
Figura 37. Hsp60 (pdb 1SJP) visualizada en Cn3D	77
Figura 38. Interacciones iónicas entre los grupos carboxilo libres de las proteínas y los metales Cd y Hg	78
Figura 39. Aminoácidos captadores de metales. En color amarillo se señalan los aminoácidos indicados en cada recuadro. Visualizada en Cn3D	78

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Disponibilidad relativa de los metales retenidos en el suelo por las plantas.	23
Tabla 2. Concentraciones máximas permisibles de mercurio en suelo de algunos países	29
Tabla 3. Concentraciones de mercurio en suelos aledaños a regiones mineras	30
Tabla 4. Artículos del decreto 1594 de 1984 que hacen referencia a las concentraciones de mercurio permisibles en aguas	30
Tabla 5. Concentraciones máximas permisibles de cadmio en suelo de algunos países.	35
Tabla 6. Artículos del decreto 1594 de 1984 que hacen referencia a las concentraciones de cadmio permisibles en aguas.	36
Tabla 7. Identificación de grupos funcionales de la glomalina según el espectro de <sup>1</sup> H-RMN	45
Tabla 8. Conteo de esporas en cultivos monospóricos (#esporas/g suelo)	59
Tabla 9. Cuantificación de glomalina en cultivos monospóricos	60
Tabla 10. Relación entre el número de esporas y el contenido de glomalina total de cultivos monospóricos	62
Tabla 11. Variación en el número de esporas antes y después de la contaminación del suelo con Hg	63
Tabla 12. Variación en la concentración de glomalina antes y después de la contaminación del suelo con Hg	65
Tabla 13. Esporulación en presencia de diferentes concentraciones de Cadmio	68

Tabla 14. Variación en la concentración de glomalina antes y después de la contaminación del suelo con Cd	70
Tabla 15. Esporulación en suelos afectados por cadmio y/o mercurio	74
Tabla 16. Incremento de la glomalina en suelos afectados por cadmio y/o mercurio	74
Tabla 17. Captación de cadmio y/o mercurio por la glomalina	75
Tabla 18. Resultados de análisis fisicoquímico de suelos	76

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
ANEXO A. Curva de calibración de Bradford	92
ANEXO B. Datos estadísticos del Anova	93
ANEXO C. Secuencia de aminoácidos de la proteína de choque térmico (HSP60), homologo putativo de la glomalina:	95

## RESUMEN

**TÍTULO:** GLOMALINA (GRSP) COMO CAPTADOR DE METALES PESADOS (Cd Y Hg) EN SUELOS IMPACTADOS\*

**AUTORA:** CAROLINA ESTEBAN CIFUENTES\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Glomalina, biorremediación de suelos, hongos micorrizicos arbusculares.

### DESCRIPCIÓN

Actualmente en Colombia y en el mundo, la prevención de la contaminación ambiental y su recuperación es una prioridad (González-Chávez, 2005), por tanto es de gran interés proponer, estudiar e investigar nuevas metodologías que permitan el restablecimiento del suelo, el aire y el agua.

De acuerdo con lo expresado por Vidal et al. (2010) se considera que los metales pesados son grandes contaminantes del suelo que afectan la agricultura y sus productos. Además, los métodos de remediación de suelos contaminados con estos metales son costosos y en ocasiones contribuyen al deterioro del sitio tratado. El propósito de este trabajo de investigación consistió en demostrar que GRSP (sigla en inglés: Glomalin related soil protein), producida por los hongos micorrizicos arbusculares (HMA), es una alternativa para llevar a cabo la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados.

Para llevar a cabo este estudio, en suelos artificiales se evaluó la tolerancia de los hongos micorrizicos arbusculares ante diferentes concentraciones de cadmio (Cd) y mercurio (Hg), observándose que los hongos micorrizicos presentan mayor tolerancia a mercurio que al cadmio. Posteriormente se realizó la extracción de glomalina en muestras de suelos contaminados por cadmio y/o mercurio. Finalmente se evaluó la capacidad de la glomalina para secuestrar metales pesados en suelos impactados con estos metales, encontrando porcentajes de captación de cadmio del 88,5% y de mercurio del 19,90%.

Teniendo en cuenta que los porcentajes de captación obtenidos en esta investigación son mayores que los obtenidos por procesos de fitoextracción (Beltran M, 2010. Vidal J, et al. 2010) y electrorremediación (Garcia L. et al. 2011) se puede considerar a la glomalina como una proteína con gran potencial para realizar biorremediación de suelos contaminados con Cd o Hg.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directores: Beatriz Elena Guerra, Doctora. José Carlos Gutiérrez, Magíster en Química.

## ABSTRACT

**TITLE:** GLOMALIN (GRSP) AS COLLECTOR OF HEAVY METALS (CD AND HG) IN SOILS IMPACTADOS

**AUTHOR:** CAROLINA ESTEBAN CIFUENTES\*\*

**KEYWORDS:** Glomalin, bioremediation of soils, arbuscular mycorrhizal fungal.

### DESCRIPTION

Currently in Colombia and worldwide, prevention of environmental pollution and recovery is a priority (Gonzalez - Chavez, 2005), so it is of great interest to propose study and research new methodologies for the restoration of soil, air and water.

According to the statement by Vidal et al. (2010) considered that heavy metals are major pollutants affecting agricultural land and its products. Additionally, methods of remediating soil contaminated with these metals are expensive and sometimes contribute to the deterioration of the treated site. The purpose of this research was to demonstrate that GRSP (glomalin related soil protein) produced by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), is an alternative to carry out the bioremediation of soils contaminated with heavy metals.

To perform this study, artificial soil tolerance of arbuscular mycorrhizal with different concentrations of cadmium (Cd) and mercury (Hg) was evaluated, it was observed that mycorrhizal fungi have a higher tolerance to cadmium mercury. Glomalin subsequently extracting soil samples contaminated by cadmium and/or mercury was performed. Finally Glomalin capacity to sequester heavy metals in soils impacted with these metals, finding cadmium uptake percentages of 88,5 % and 19,90 % of the mercury was evaluated.

Given that uptake rates obtained in this study are higher than those obtained by processes fitoextraction (Beltran M, 2010. Vidal J, et al. 2010) and electrorremediation (L. Garcia et al. 2011) can be considering glomalin as a protein with great potential for bioremediation of contaminated soils with Cd or Hg.

---

\* Work degree

\*\* Faculty of Science. School of Chemistry. Directors: Beatriz Elena Guerra, Doctor. José Carlos Gutiérrez, Master in Chemistry

## INTRODUCCIÓN

La contaminación de suelos con metales pesados resultante de la actividad minera y algunos procesos industriales son un gran problema ambiental de alto impacto sobre los ecosistemas y la salud humana, estos contaminantes en el suelo pueden llegar directamente a los alimentos o transformarse en especies más tóxicas, ingresar a la cadena trófica y llegar al hombre donde genera graves problemas neurológicos y de teratogénesis.

En Colombia se estima que al año se liberan entre 80 y 100 toneladas de mercurio a causa de la explotación aurífera, lo cual ocasiona problemas de contaminación cerca de las minas de oro (Carbonell et al. 1995), este metal produce alteraciones en el sistema respiratorio, gastrointestinal, cardiovascular y nervioso. Sus efectos pueden ser muy variables, y en caso agudo puede producir la muerte.

Por otra parte el cadmio, otro metal pesado potencialmente peligroso es liberado al suelo, al agua y al aire durante la extracción y refinación de metales no ferrosos, la manufactura y aplicación de abonos de fosfato, la combustión de combustibles fósiles, y la disposición e incineración de basura, lo cual hace que se encuentre comúnmente como contaminante del suelo de cultivos agrícolas.

Desafortunadamente el cacao colombiano está siendo rechazado en Europa por contener altos porcentajes de cadmio (Mira, 2011) ya que ingerir alimentos con niveles de cadmio muy altos causa irritación grave del estómago, lo que produce diarrea y en ciertas ocasiones la muerte (ATSDR, 2008). Por estas razones Vidal et.al. (2010) hacen énfasis en la importancia de remediación de las zonas contaminadas por metales pesados, entre ellos Hg y Cd, debido a los graves efectos que causan en la cadena alimenticia.

Esta investigación propone una alternativa para bioacumular Hg y Cd de suelos impactados mediante el empleo de la glomalina, una sorprendente proteína del suelo.

## 1. MARCO TEÓRICO Y DE ANTECEDENTES

Para remediar suelos contaminados con metales pesados se han desarrollado diferentes procesos como la excavación, fijación y lixiviación las cuales son altamente costosas (Vidal et al. 2010), otras tecnologías son la fitorremediación o fitorrecuperación del suelo empleando plantas que ayudan a retener los contaminantes del suelo, disminuir o eliminar su toxicidad (Millán et al. 2007).

Dentro de los métodos biológicos una de las alternativas de bajo costo con enormes ventajas ambientales es el uso de microorganismos rizosféricos, los cuales establecen simbiosis con la mayoría de las plantas superiores, formando un vínculo directo entre el suelo y raíces de la planta, estos hongos se producen en prácticamente todos los ecosistemas del mundo, incluyendo en suelos degradados con alto contenido de metales pesados como los afectados por actividades mineras (González-Chávez, 2005).

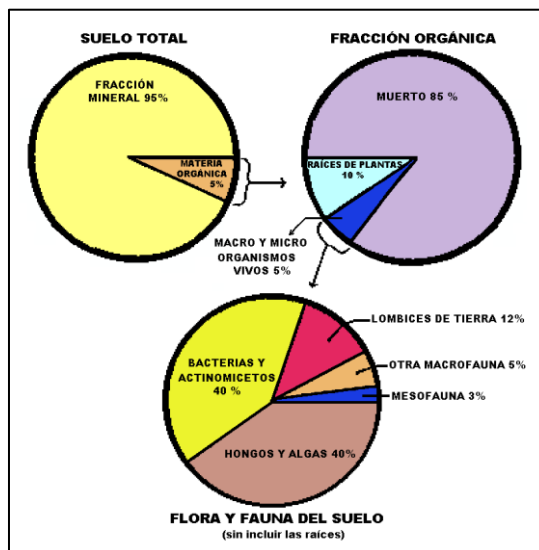
Los HMA son hongos comunes del suelo, de la división Glomeromycota, que establecen relaciones simbióticas en un 85% con las raíces de la mayoría de plantas vasculares, ellos producen “la glomalina”, una glicoproteína que según estudios recientes puede enlazar y secuestrar algunos metales pesados (Cornejo et al., 2008). En este trabajo se aisló la glomalina de suelos artificiales previamente dotados con micorrizas y se evaluó la captación o remoción de Hg y Cd, los resultados mostraron que esta proteína es una alternativa viable y económica para recuperar los suelos contaminados.

## 1.1 COMPOSICIÓN DEL SUELO

El término suelo designa la capa superficial de la tierra, está formado por componentes inorgánicos y diferentes porcentajes de sustancias orgánicas. La materia orgánica que contiene el suelo procede tanto de la descomposición de los seres vivos que mueren sobre ella, como de la actividad biológica de los organismos vivos que contiene: lombrices, insectos de todo tipo, microorganismos, etc.

La descomposición de estos restos y residuos metabólicos da origen a lo que se denomina humus. En la composición del humus se encuentra un complejo de macromoléculas en estado coloidal constituido por proteínas, azúcares, ácidos orgánicos, minerales, etc, en constante estado de degradación y síntesis (Higueras y Oyarzun, 2004).

**Figura 1. Composición porcentual del suelo.**



Fuente: Química de suelos: Valencia, (2008)

La fracción inorgánica constituye el 95% en suelos de regiones secas y menos del 10% en suelos orgánicos (pantanosos). Esta fracción se clasifica en:

- (i) Minerales primarios: silicatos, óxidos o hidróxidos, carbonatos y fosfatos
- (ii) Minerales secundarios: arcillas (partículas finas)
- (iii) Elementos minoritarios: micronutrientes (B, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Se, Zn)
- (iv) Contaminantes (metales pesados): (Cd, Hg, Pb, Cu, Sb, Bi) (Muñoz y Delgado, 2006).

**1.1.1 Metales pesados en el suelo.** Se consideran metales pesados a aquellos metales cuyo peso atómico es mayor que el hierro (55,85g/mol) (Galán y Romero, 2008). Aunque generalmente se habla de metales pesados para hacer referencia a elementos metálicos sin función biológica conocida, que en determinadas concentraciones en los seres vivos causan daños en el funcionamiento de su organismo, resultando ser altamente tóxicos.

La presencia de metales pesados en el suelo debería de ser exclusivamente de origen geogénico, es decir, de origen natural atribuidos a la composición de distintos minerales presentes en el suelo. Desafortunadamente, las mayores concentraciones de metales en el suelo son de origen antropogénico (resultado de las actividades del hombre por actividades industrial, minera y agrícola) (SAG, Ministerio de Agricultura de Chile).

Los metales pesados en el suelo pueden seguir diferentes rutas:

- (i) Quedar retenidos en el suelo
- (ii) Ser adsorbidos por las plantas
- (iii) Pasar a la atmosfera por volatilización
- (iv) Movilizarse a aguas superficiales o subterráneas.

**Tabla 1. Disponibilidad relativa de los metales retenidos en el suelo por las plantas.**

Forma del metal en el suelo	Movilidad-Disponibilidad relativa
iones simples o complejos en solución	Fácil
Cationes de cambio	Media
Metales quelatados por compuestos orgánicos	Menos disponibles
Metales adsorbidos sobre partículas del suelo	Menos disponibles
Compuestos metálicos precipitados sobre partículas del suelo	Disponibles cuando se disuelve el compuesto
Metales asociados o incorporados a una matriz biológica	Disponibles cuando se descompone
Metal asociado o formando parte de la estructura de un mineral	Disponibles cuando se meteoriza

Fuente: Galán y Romero, (2008)

La toxicidad de un contaminante no solo depende de sí mismo sino de las características del suelo. Por ejemplo, el pH influye en la adsorción y solubilidad del metal en el suelo. A pH ácidos los metales presentan mayor movilidad. A pH alcalino los metales tienden a precipitar como hidróxidos. En forma catiónica los metales tienden a estar en la superficie, siendo más accesibles a los vegetales (Muñoz y Delgado, 2006).

## 1.2 MERCURIO

El mercurio es el único metal líquido de color plateado a temperatura ambiente, tiene un punto de fusión de  $-39^{\circ}\text{C}$  y un punto de ebullición de  $357^{\circ}\text{C}$ , por debajo del punto de fusión es un sólido de color blanco y por encima del punto de ebullición es un gas incoloro. Tiene una densidad de  $13,58\text{g/mL}$ , una masa molar de  $200,59\text{g/mol}$  (Lenntech, 1998). Su símbolo químico (Hg) proviene del nombre que le dieron los griegos: “*hydrargiro*”. (Muñoz y Delgado, 2006).

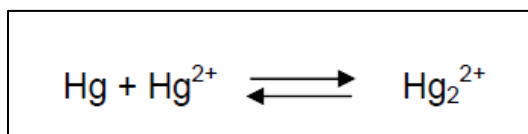
**Figura 2. El mercurio.**



Fuente: Enciclopedia de salud, dietética y psicología. Definición de mercurio. Disponible en: <http://www.encyclopediasalud.com/definiciones/mercurio> y <http://blog.neomed.es/el-mercurio-y-la-salud/#>

En sus compuestos, el mercurio se encuentra en los estados de oxidación 2+ (ion mercúrico), 1+ (ion mercurioso  $\text{Hg}^{+2}_2$ ). Estas especies coexisten en equilibrio con su estado elemental, tal como se muestra en la figura 3. (Muñoz y Delgado, 2006).

**Figura 3. Equilibrio entre las especies del mercurio.**



El mercurio es un metal pesado considerado peligroso para el medio ambiente y la salud, es por ello que hoy en día sus usos y aplicaciones están siendo disminuidos.

**1.2.1 Suelos contaminados con mercurio.** Los metales pesados están presentes en el suelo como componentes naturales del mismo o como consecuencia de la actividad del hombre. Entre los impactos más graves que sufre el suelo se puede destacar la contaminación por metales pesados, por su lenta y difícil restauración. Uno de los metales pesados más tóxicos que se conocen es el mercurio, considerado un contaminante a escala global, el cual causa graves daños al medio

ambiente y a la salud humana como resultado de su movilidad (Abdul, 2006). Este elemento ha dejado huella en la historia de la humanidad con casos muy conocidos como el de Mimamata, el envenenamiento con mercurio orgánico en Iraq o la exposición a metil mercurio en el Amazonas (Millán et al. 2007).

El mercurio es un elemento ampliamente utilizado en la minería para extraer oro de sedimentos y suelos, produciendo así uno de los principales problemas de contaminación por metales pesados. El mercurio se añade a los suelos y rocas que contienen partículas de oro, para formar una amalgama, la cual es luego quemada para separar el oro y liberar los vapores de mercurio. En el proceso de amalgamamiento siempre se utiliza un exceso de Hg el cual en el proceso se pierde como pequeñas gotas y pasa a contaminar los suelos y los ríos. Así mismo el mercurio volatilizado regresa al suelo por la acción del agua de lluvia (Rojas et al. 2008).

El mercurio se encuentra en tres formas distintas: (i) El mercurio como elemento, es el único elemento metálico en estado líquido a temperatura ambiente. (ii) El mercurio inorgánico, en la naturaleza se encuentra principalmente en esta forma. (iii) Y por último el mercurio orgánico, como metilmercurio, etilmercurio y fenilmercurio (Duque, 2011).

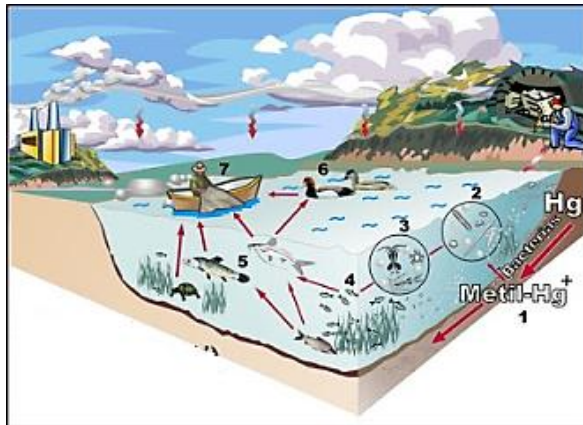
El mercurio existe en tres estados de oxidación:  $\text{Hg}^0$ ,  $\text{Hg}^{+2}$  y  $\text{Hg}_2^{+2}$ , donde  $\text{Hg}^{+2}$  es el estado de oxidación más estable del mercurio (Olivero y Johnson 2002). El mercurio aparece de forma natural en el suelo como  $\text{Hg}^{+2}$ , fundamentalmente por depósito atmosférico y por la descomposición de la vegetación. La movilidad del mercurio en suelos queda determinada por la solubilidad de las especies químicas  $\text{Hg}(\text{OH})_2$ ,  $\text{HgS}$ , y  $\text{Hg}^0$  (Millán et al. 2007).



Sin embargo, bajo ciertas condiciones puede producirse movilización, allí donde tanto el pH como las concentraciones de cloruros en la solución del suelo sean favorables para la formación de complejos. En suelos ácidos (pH 3 a 5), los complejos con materia orgánica soluble tienen también una contribución elevada a la solubilidad del Hg, aunque en suelos neutros o con poca materia orgánica, la solubilidad estaría dominada por los óxidos de Fe y los minerales de la arcilla, y la movilidad de Hg aumentará al disminuir el pH (Millán et al. 2007).

**1.2.2 Efectos del mercurio en la salud.** El mercurio presente en el suelo puede llegar al hombre tal como se observa en la figura 4, siguiendo el ciclo biogeoquímico. En los humanos la absorción del mercurio puede ocurrir por cualquier vía. La vía respiratoria es la más importante en los ambientes de trabajo, incluyendo la minería. Se calcula que el 80% de los vapores inhalados se absorben en el alvéolo, en especial los de mercurio metálico (Molina et al. 2003).

**Figura 5. Ciclo biogeoquímico de mercurio.**



Fuente: Medicina biológica (Duque, 2011)

La vía digestiva es poco importante en las intoxicaciones profesionales, dado que el mercurio metálico casi no se absorbe por esta vía, mientras que para los derivados orgánicos es la vía más importante como es el caso del metilmercurio el

cual se absorbe en un 95%. En cuanto a las mujeres en estado de gestación el metilmercurio atraviesa fácilmente la barrera placentaria y se acumula en el feto con eventos graves sobre la salud.

Bajo su forma ionizada, el mercurio se fija en los sustituyentes orgánicos celulares ricos en grupos-SH (sulfidrilo); es capaz de unirse también con grupos fosforilos, carboxilo, amida y amina, afectando así a diversos sistemas principalmente el sistema nervioso central, estomatológico, renal y dérmico. Su acción tóxica se centra en la inhibición de diversas enzimas clave para el funcionamiento del organismo, pero dicho efecto no se reduce a estos cambios sino que puede generar precipitación de proteínas sintetizadas por las neuronas, disminuye la producción energética celular y la actividad mitocondrial por disfunción enzimática.

El mercurio también perturba los sistemas de transporte del túbulo proximal renal, transporte de potasio y ATP-asa de membrana. Disminuye el transporte activo de azúcares, aminoácidos y precursores de ácido nucleico en las proteínas estructurales y en los complejos enzimáticos, provocando así la muerte celular. Al parecer, las células más sensibles serían las neuronas del cerebro y cerebelo.

La intoxicación crónica por mercurio produce alteraciones en el Sistema Nervioso Central (SNC) inicialmente aparecen trastornos psíquicos como irritabilidad, tristeza, ansiedad, insomnio, temor, pérdida de memoria, excesiva timidez, labilidad emocional, hiperexcitabilidad o depresión, a todo a este conjunto de síntomas se ha denominado "Eretismo mercurial". También se presenta el temblor, que dificulta los movimientos que exigen precisión.

El mercurio afecta el Sistema Gastrointestinal puede presentarse náuseas, vómito y diarrea. El hallazgo más significativo es la llamada "estomatitis mercurial", cuyo principal síntoma es la sialorrea (salivación excesiva); posteriormente aparece

gingivitis y ulceraciones en la mucosa oral. Existe caída prematura de los dientes y en las encías puede aparecer un ribete grisáceo azulado (“Ribete de Gilbert”).

En la intoxicación con compuestos orgánicos (metilmercurio), el comienzo es insidioso que se caracteriza por astenia (debilidad), apatía, depresión y a veces deterioro intelectual. Posteriormente aparecen parestesias (hormigueos) en áreas dístales de las extremidades, en la lengua y en la boca. Cuando la intoxicación está establecida, se observa ataxia (pérdida de equilibrio), disartria (dificultad para hablar), parálisis motoras y alteraciones sensoriales (diplopía, estrechamiento del campo visual y sordera). La sintomatología es consecuencia de una neuroencefalopatía tóxica con afectación de cerebro y cerebelo.

El metilmercurio atraviesa la placenta y se concentra en el feto. La enfermedad congénita afecta a los recién nacidos y se traduce por una parálisis cerebral con retraso mental, dificultades en la alimentación y déficit motor importante. En los casos menos severos, pueden parecer completamente normales y desarrollar el déficit neurológico una vez madurado el SNC. (Muñoz y Delgado, 2006).

**1.2.3 Niveles de mercurio permitidos.** Hasta el momento en Colombia no se ha encontrado ningún tipo de documento que haga referencia a los niveles máximos permisibles del mercurio en suelos (Muñoz y Delgado, 2006). Sin embargo, en algunos países se han establecido los siguientes rangos de concentraciones:

**Tabla 2. Concentraciones máximas permisibles de mercurio en suelo de algunos países**

País	Concentración máxima permisible de Hg en suelo (ppm)	Referencia
México	Agrícola: 23. Industrial: 310	Huerta H, (2010)
Ecuador	Agrícola: 0,8. Industrial: 10	Decreto N° 3.516, (2003)

<b>País</b>	<b>Concentración máxima permisible de Hg en suelo (ppm)</b>	<b>Referencia</b>
Nicaragua	0,5-3,0	Navarrete O, (2010)
España	<1-2	Galán y Romero, (2008)

La contaminación del suelo con mercurio a nivel mundial es variable, incluso en zonas cercanas a regiones mineras, donde se han encontrado suelos con niveles de mercurio desde 0,05 hasta 1710ppm.

**Tabla 3. Concentraciones de mercurio en suelos aledaños a regiones mineras**

<b>Suelo</b>	<b>Concentración de Hg en suelos (ppm)</b>
Almaden, España	5,03-1710
Las Claritas, Venezuela	0,2-1,9
San Francisco de Oro, Perú	10-204
El Callao, Venezuela	0,05-20,066

En Colombia se rige el decreto 1594 de 1984, actualizado en el decreto 3930 de 2010, el cual en el capítulo III trata de la destinación genérica de las aguas superficiales, subterráneas, marítimas, estuarías y servidas y menciona las concentraciones permisibles de mercurio en aguas, en los siguientes artículos:

**Tabla 4. Artículos del decreto 1594 de 1984 que hacen referencia a las concentraciones de mercurio permisibles en aguas**

<b>Artículo</b>	<b>Enunciado</b>
20	El mercurio es considerado una sustancia de interés sanitario
38-39	La concentración admisible de mercurio en aguas para el consumo humano y domestico es de

Artículo	Enunciado
	0,002mg/L
40	La concentración admisible de mercurio en aguas para uso agrícola es de 0,01mg/L
41	La concentración admisible de mercurio en aguas para uso pecuario es de 0,01mg/L
45	La concentración admisible de mercurio en aguas para la preservación de flora y fauna en aguas dulces y marinas es de 0,01mg/L
74	La concentración para el control de la carga de mercurio total es de 0,02mg/L. La concentración de mercurio orgánico no debe ser detectable
91	No se admite ningún tipo de vertimiento en las cabeceras de las fuentes de agua, ni en un sector aguas arriba de las bocatomas para agua potable ni en cuerpos de agua protegidos

Este decreto no menciona los niveles máximos permitidos de metales pesados en suelos.

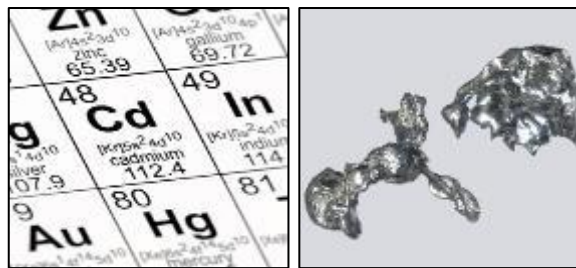
### 1.3 CADMIO

Elemento químico con símbolo Cd, número atómico 48 y masa molar de 112,4g/mol. Es un metal dúctil, de color blanco argentino con un ligero matiz azulado. Es más blando y maleable que el zinc, pero poco más duro que el estaño.

El cadmio tiene una densidad 8,65g/mL a 20°C, punto de fusión de 320,9°C y de ebullición de 765°C. El cadmio es miembro del grupo IIb (grupo del zinc, cadmio, mercurio y copernicio) en la tabla periódica, es divalente en todos sus compuestos estables y su ion es incoloro (Lenntech, 1998). Usualmente es encontrado como óxido de cadmio, cloruro de cadmio, sulfato de cadmio y/o sulfuro de cadmio.

El cadmio es un metal pesado que ha adquirido una gran importancia toxicológica. A partir de la mitad del siglo pasado, la producción y el uso de cadmio al nivel industrial se ha expandido rápidamente, y su eliminación se ha convertido en un serio problema para el ambiente. Los usos más habituales de este metal son en la industria de la galvanoplastia, la fabricación de baterías y la estabilización de algunos plásticos, aunque el cadmio se ha utilizado también en la elaboración de algunos plaguicidas y fertilizantes. (ATSDR, 2011)

**Figura 6. El cadmio.**



Fuente: Elementos de la tabla periódica y sus propiedades. Cadmio. Disponible en: <http://elementos.org.es/cadmio>

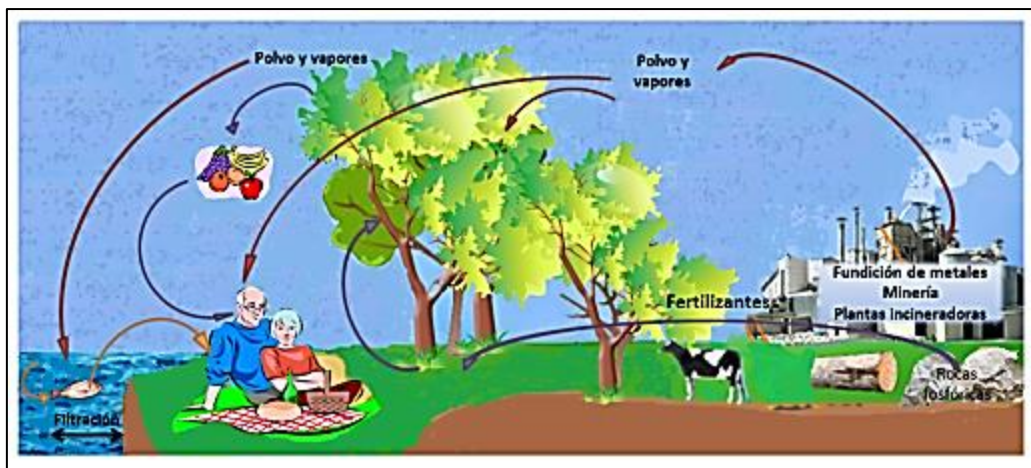
El cadmio no se considera un elemento esencial, ni para los animales ni para las plantas, puesto que no cumple ningún papel o función biológica en el organismo, y por el contrario se considera altamente tóxico tanto para las plantas como para los animales (Acosta M y Montilla J, 2011)

**1.3.1 Suelos contaminados con cadmio.** En los últimos años se ha reportado un progresivo aumento en los niveles de cadmio en algunos suelos agrícolas como consecuencia de una prolongada fertilización fosfatada ya que las rocas fosfóricas que son materia prima de todos los fertilizantes fosfáticos, contiene niveles de metales pesados que varían según su origen geográfico y se ha llamado la

atención sobre la posibilidad de mayores incrementos en otros suelos debido al uso agrícola de lodos residuales (Lenntech, 1998).

A partir de las aguas residuales urbanas se obtienen lodos que por su contenido de nutrientes son usados en la fertilización de algunos cultivos y que debido a sus altos niveles en materia orgánica se ha comprobado que pueden ser útiles en la recuperación de suelos afectados por procesos de desertificación. Cuando estos lodos provienen de aguas que han recibido efluentes industriales, su aplicación continua en áreas agrícolas puede producir la acumulación de estos elementos en los suelos. Entre los metales pesados que pueden estar presentes en los lodos, el cadmio es el que genera más riesgos ambientales por su movilidad en los suelos y la facilidad con que es absorbido por las plantas (Herrera, 2001).

**Figura 7. Ciclo biogeoquímico del cadmio.**

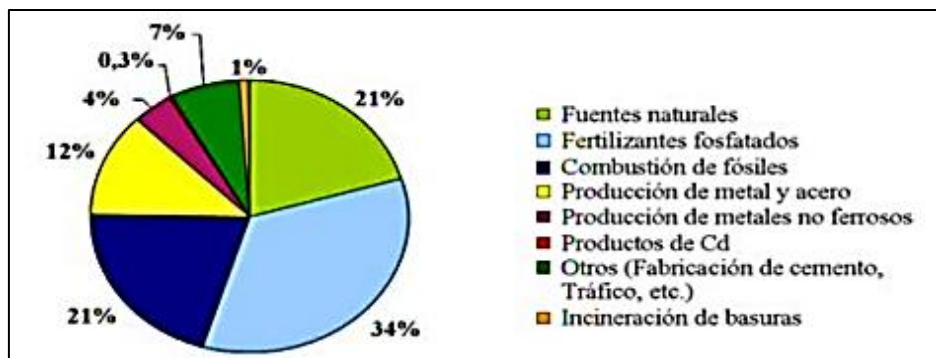


Fuente: Disponible en: <http://campus.almagro.ort.edu.ar/cienciasnaturales/2do/articulo/422647/ciclo-del-carbono> y adaptada por la autora

Otras fuentes de contaminación con cadmio son los aportes aéreos, en forma de polvo y vapores, provenientes de explotaciones mineras, de fundiciones de metales y de plantas incineradoras. Los materiales fósiles o sus derivados que se

usan como combustibles contienen metales pesados y éstos pasan a la atmósfera volatilizados o en cenizas para luego ser depositados en los suelos, la cubierta vegetal y las masas de agua, pudiendo así producir contaminación de la cadena trófica. Los metales presentes en el carbón mineral pueden originar contaminación en áreas próximas a plantas termoeléctricas y se han encontrado mayores niveles de cadmio en suelos urbanos y cercanos a vías de fuerte tránsito automotor (Herrera, 2001).

**Figura 8. Fuentes de contaminación de cadmio.**



Fuente: Toxicidad del cadmio en plantas (Lara y Lozano, 2011)

**1.3.2 Efectos del cadmio en la salud.** El cadmio llega a los humanos principalmente a través de la comida. Los alimentos que son ricos en Cadmio (champiñones, mariscos, mejillones, cacao y algas secas) pueden en gran medida incrementar la concentración de Cadmio en los humanos. Un exceso en los niveles de cadmio en los humanos pueden causar: diarreas, dolor de estómago, vómitos severos, debilidad de los huesos, fallas en la reproducción y posibilidad incluso de infertilidad, daño al sistema nervioso central, posible daño en el ADN o desarrollo de cáncer, daño al sistema inmune y desordenes psicológicos (Lenntech, 1998).

El Cadmio primero es transportado hacia el hígado por la sangre. Allí es unido a proteínas para formar complejos que son transportados hacia los riñones. El Cadmio se acumula en los riñones, donde causa un daño en el mecanismo de filtración. Esto causa la excreción de proteínas esenciales y azúcares del cuerpo y el consecuente daño de los riñones. Lleva bastante tiempo antes de que el Cadmio que ha sido acumulado en los riñones sea excretado del cuerpo humano (Lenntech, 1998).

**1.3.3 Niveles de cadmio permitidos.** Colombia aún no tiene un decreto o norma que indique la máxima concentración permisible de cadmio en suelo. En la tabla 5, se relacionan los niveles permisibles en algunos países.

**Tabla 5. Concentraciones máximas permisibles de cadmio en suelo de algunos países.**

País	Concentración máxima permisible de Cd en suelo (ppm)	Referencia
México	3-5,8	Vasquéz-Alarcón et al., 2005
Ecuador	Agrícola: 2. Industrial: 10	Decreto N° 3.516, 2003
Canadá	Agrícola: 3,8. Industrial: 10	Acosta M y Montilla J, 2011
España	<1-2	Galan y Romero, 2008

En Colombia se rige el decreto 1594 de 1984, actualizado en el decreto 3930 de 2010, el cual no menciona los niveles máximos permitidos de metales pesados en suelos pero habla de las concentraciones de cadmio permisibles en aguas en los siguientes artículos:

**Tabla 6. Artículos del decreto 1594 de 1984 que hacen referencia a las concentraciones de cadmio permisibles en aguas.**

Artículo	Enunciado
20	El cadmio es considerado una sustancia de interés sanitario
38-39	La concentración admisible de cadmio en aguas para el consumo humano y doméstico es de 0,01mg/L
40	La concentración admisible de cadmio en aguas para uso agrícola es de 0,01mg/L
41	La concentración admisible de cadmio en aguas para uso pecuario es de 0,05mg/L
45	La concentración admisible de cadmio en aguas para la preservación de flora y fauna en aguas dulces y marinas es de 0,01mg/L
74	La concentración para el control de la carga de cadmio total es de 0,1mg/L.
91	No se admite ningún tipo de vertimiento en las cabeceras de las fuentes de agua, ni en un sector aguas arriba de las bocatomas para agua potable ni en cuerpos de agua protegidos

#### **1.4 BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS**

Para remediar suelos contaminados con mercurio se ha diseñado tecnologías físicas del tratamiento como la excavación, fijación y lixiviación que presentan costos elevados y además contribuyen con el deterioro del sitio tratado.

Por otra parte, los métodos biológicos de recuperación de suelos contaminados por metales pesados el uso de plantas (fitorecuperación) y microorganismos rizosféricos (biorecuperación) representa una alternativa de bajo costo y con enormes ventajas ambientales.

La bio y fito recuperación son técnicas que se pueden aplicar *in situ* reduciendo así el riesgo de exposición para el personal que limpia y transporta el material contaminado. El impacto ambiental es mínimo, porque estas alternativas son

procesos naturales y útiles para la completa transformación de una amplia variedad de contaminantes. Además, puede recuperarse un sitio sin causar perturbación en sus actividades normales ya que consisten en la utilización de plantas o microorganismos que acumulan o retienen el contaminante en sus tejidos disminuyendo su impacto sobre los ecosistemas y la salud humana reduciendo o eliminando su toxicidad (Vidal et al. 2010).

Para alcanzar el éxito de estos métodos biológicos debe realizarse la selección adecuada de especies microbianas o plantas que se adapten a las condiciones de contaminación, las cuales son específicas para cada suelo (Millán et al., 2007).

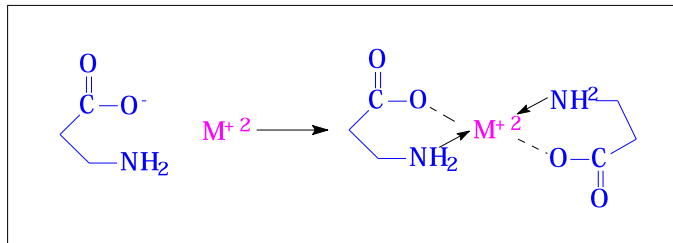
En especial, los hongos que se establecen en las raíces de las plantas, formando micorriza arbuscular y otros mutualistas de la rizosfera representan un promisorio elemento microbiológico en la recuperación de suelos contaminados. Varios reportes mencionan que los hongos micorrízicos auxilian a las plantas a establecerse y crecer en condiciones de estrés, como: suelos salinos, contaminados con metales pesados, plaguicidas e hidrocarburos y también la protegen contra enfermedades de la raíz (Batista et al. 2009. González-Chávez, 2005).

Las proteínas en la pared celular de los HMA tienen la habilidad de absorber elementos potencialmente tóxicos por secuestro de los mismos, Gonzales-Chávez et al. (2004) demostraron que esta habilidad se debe a la glomalina, una glicoproteína que puede enlazar y secuestrar algunos metales pesados como Cu, Cd, Pb y Zn (Rodríguez et al. 2004, Cornejo et al. 2008).

## 1.5 CAPTACIÓN DE METALES PESADOS POR PROTEÍNAS

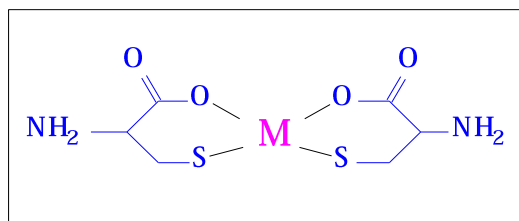
Las proteínas, contienen grupos aminos libres, hidroxilos, carboxilos y otros que pueden ser excelentes sitios para enlazar metales como  $\text{Cu}^{+2}$  y similares (González-Chávez, 2004).

**Figura 9. Unión del metal a los grupos amino y carboxilo de la proteína**



La unión de las proteínas al metal puede darse por interacciones iónicas a los grupos carboxilos, mediante adsorción por fuerzas de Van der Waals, por unión a grupos sulfhídricos y rara vez mediante enlace covalente. Los metales pesados tienen preferencia por la unión a los grupos  $-\text{SH}$  formando complejos muy estables (figura 10). (Dep Medicina Legal, 2013)

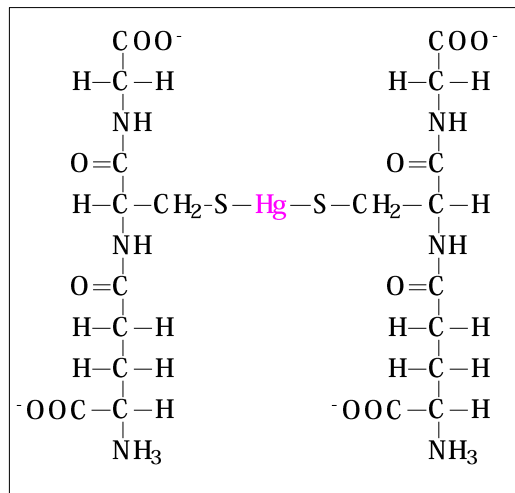
**Figura 10. Complejo formado por la unión de metales pesados a grupos  $-\text{SH}$  de proteínas.**



Algunos metales pesados como el mercurio tienen gran afinidad por aminoácidos como la cisteína y la metionina, formando complejos con dos cisteínas o incorporándose en medio de puentes disulfuro (Duque G, 2011), como se muestra en la figura 11.

El metal unido a las proteínas, disminuye su movilidad y difusión ya que adquiere un gran tamaño molecular que le impide difundirse a los tejidos de los seres vivos. (Dep Medicina Legal, 2013)

**Figura 11. Incorporación de mercurio en medio de puentes disulfuro.**



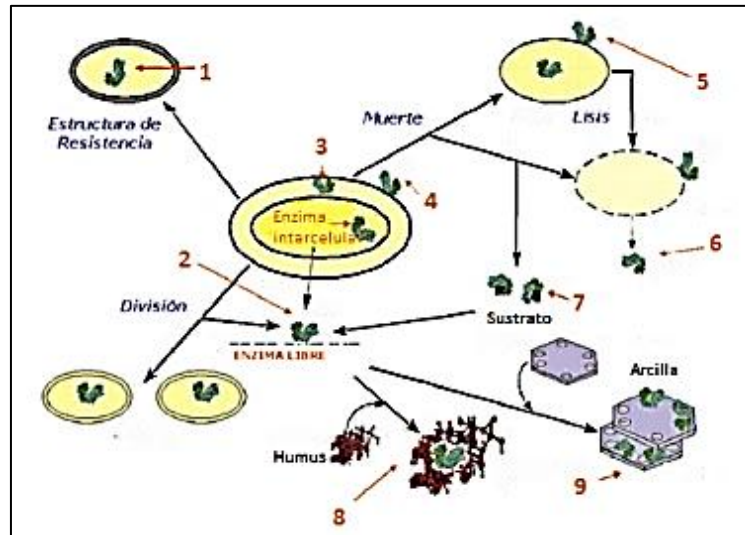
Cuando los metales pesados se enlazan a los grupos aminos, carboxilos libres y sulfhidrilos de las proteínas pueden precipitarla e incluso causar serios daños hasta la desnaturalización, esto depende de la resistencia, solubilidad y punto isoeléctrico de la proteína (Alices-Villanueva, 2009)

## 1.6 PROTEÍNAS DEL SUELO

Las proteínas presentes en el suelo provienen principalmente de la actividad microbiana, ya que los microorganismos del suelo y la rizosfera liberan enzimas al suelo a través de secreción y lisis celular, un bajo porcentaje de estas proteínas quedan inmovilizadas y estabilizadas con diferentes componentes de la fase sólida del suelo, como las arcillas, moléculas orgánicas y complejos organominerales.

La mayoría de las proteínas del suelo tienen funciones enzimáticas de diferentes tipos, tal como se observa en la figura 12.

**Figura 12. Enzimas en el suelo.**



1 Enzima dentro de células latentes (esporas, semillas, quistes, endoesporas). 2 Enzima liberada durante el crecimiento o la división. 3 Enzima periplasmática. 4 Enzima unida a la superficie exterior de la membrana celular. 5 Enzima unida a células muertas y detritos. 6 Enzima liberada de la célula lisada. 7 Enzima

temporalmente asociada a complejos enzima sustrato. 8 Enzima formando complejos con coloides húmicos. 9 Enzima adsorbida en la superficie de arcilla.

## **1.7 GLOMALINA**

En el suelo los hongos micorrízicos arbusculares producen una glicoproteína insoluble de color marrón o marrón-rojizo (Wright et al. 2006), de elevado peso molecular denominada glomalina.

Esta proteína fue descubierta en 1996 por Sara F. Wright, científica del suelo del Servicio de Investigación Agrícola (ARS) quien la señaló como “el héroe secreto del suelo” por sus múltiples funciones, ya que es una proteína pegajosa que estabiliza el suelo, sella y solidifica el exterior de los filamentos del hongo que parecen tubos y que transportan agua y nutrientes a la planta, ayuda a la arena, el cieno y las partículas de arcilla a pegarse con la materia orgánica que da vida al suelo (Rillig M. y Steinberg P. 2002). Además la glomalina es la sustancia que provee una buena textura al suelo (Driver et al., 2004), la estructura necesaria para retener agua y para una aeración apropiada, también previene el escape de carbono del suelo a la atmósfera (ARS, 2002).

Antes se pensaba que el ácido húmico era la sustancia que almacenaba la mayoría del carbono, pero Kristine Nichols encontró que el ácido húmico solo almacenaba el 8% de C y la glomalina el 27% (ARS, 2002).

Seguel et al., en el 2008 cuantificaron el contenido de glomalina en un andisol del sur de Chile bajo bosque mixto adulto y estudiaron su relación con las características fúngicas y químicas del suelo, donde encontraron que especies acompañantes, arbustos y trepadoras presentaron micorrizas arbusculares

capaces de producir altos niveles de glomalina, superiores a los agrosistemas de la misma área. La glomalina total mostró estrecha relación con las esporas de los HMA y la materia orgánica. Finalmente sugieren la necesidad de preservar los ecosistemas forestales para mantener el potencial micorrízico y los altos niveles de glomalina que pueden ser un reservorio de carbono, contribuyendo a la retención de CO<sub>2</sub> atmosférico (Seguel et al. 2008).

La glomalina se ha encontrado en suelos de diversos ecosistemas y con relativa abundancia, teniendo una vida media de 6 a 42 años. Su estructura química aún se desconoce aunque se ha informado que está compuesta por complejo de aminoácidos, carbohidratos y hierro (<5%), además contiene un alto porcentaje de carbono (29,7-43,1%) llegando incluso hasta el 52% del carbono total de suelos orgánicos (Seguel et al. 2008). La molécula de glomalina parece ser un complejo de estructuras monoméricas repetidas con interacciones hidrofóbicas (González-Chávez, 2004).

Esta glicoproteína es producida por las hifas de los HMA (Abdul, 2006) y posee una fuerte capacidad de sedimentación de las partículas de suelo (Borie et al. 2008). El comportamiento recalcitrante de la glomalina junto a su naturaleza glicoproteína y su aparente característica hidrófoba que protege las hifas de las pérdidas de nutrientes y agua, sugiere que es una biomolécula muy estable (Morales et al., 2006) y de difícil extracción.

Teniendo en cuenta que la extracción de la glomalina es extremadamente drástica por su difícil solubilización y su alta resistencia química, esta proteína se cuantifica en el suelo bajo la definición de proteína del suelo relacionada a la glomalina (GPRS) (Borie et al. 2008).

**Figura 13. La glomalina en una raíz de maíz.**



Fuente: Publicación del departamento de Agricultura de los Estados Unidos el 17 de junio de 2008.

Las concentraciones de glomalina en los suelos, generalmente se encuentran en varios miligramos por gramo de suelo y pueden lograr exceder los  $100 \text{ mg/ g}^{-1}$  de suelo. La glomalina se encuentra en la pared celular de las hifas de las micorrizas arbusculares y es incorporada al suelo principalmente a través de la muerte constante de estas hifas (Faerron, 2007).

**1.7.1 Uso de la glomalina como captador de metales.** Por otra parte, es de gran importancia resaltar que en los últimos años ha surgido la hipótesis de que la glomalina tiene un papel importante en la inmovilización de metales pesados por la presencia de grupos amino, hidroxilo, carboxilo y otros grupos libres que pueden enlazar elementos potencialmente tóxicos (Abdul, 2006).

Gonzalez-Chavez et al. en el 2004 basaron su hipótesis en que la glomalina del suelo puede atrapar elementos potencialmente tóxicos como Cu, Cd, Pb y Mn. En esta investigación se encontró que in vitro, la glomalina aislada de *Gigaspora rosea* secuestra  $28 \text{ mg Cu/g}$  y se concluyó que la glomalina puede bioestabilizar y remediar suelos contaminados (González-Chávez, 2004).

Cornejo et al., en el 2008 estudiaron la cantidad de GRSP y su contribución al secuestro de Cu y Zn en suelos. Se encontró que la GRSP llega a atrapar cerca de un 27,5% del Cu y Zn total que contiene el suelo. Con este estudio se concluyó

que el uso de la glomalina es un mecanismo muy eficiente para mitigar el estrés y conducir a la estabilización de los suelos altamente contaminados por las actividades mineras (Cornejo et al. 2008).

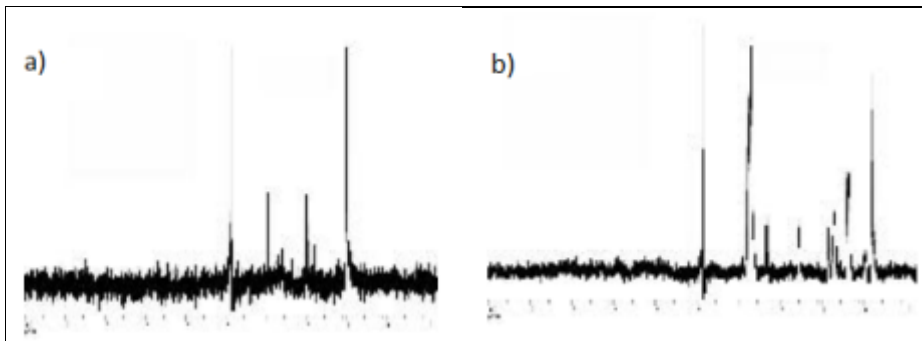
**1.7.2 Estudio de la estructura de la glomalina.** Desde 1996 cuando la científica Sara Wright del Departamento de agricultura de los Estados Unidos descubrió y dio nombre a la glomalina, se ha venido trabajando en elucidar su estructura química. Hoy se conoce que la glomalina es una glicoproteína enlazada con hierro (Fe), lo cual le confieren gran estabilidad molecular (Janos D. et al. 2008). Esta proteína es difícil de hidrolizar con ácido o proteasas, además requiere de altas temperaturas para solubilizarse.

Estudios de la estructura de la proteína con electroforesis capilar (HPCE) indicaron que la glomalina es una proteína con enlaces N-glucosídico que unen la asparagina con una cadena de carbohidrato.

Los porcentajes de carbono, nitrógeno e hidrogeno en el extracto de la glomalina fueron determinados por combustión con un analizador Perkin-Elmer, obteniéndose que la proteína contiene alrededor de 34,55% de C; 3,00% de N y 4,07% de H. Por Adsorción atómica se determinó un porcentaje de hierro de 4,1%.

Se realizó cromatografía en columna empleando una columna fenil y una columna de afinidad lectina, después de la purificación se deglicosiló la glomalina para examinarla por RMN (Resonancia magnética nuclear), en los espectros (figura 14) se observó los picos relacionados en la tabla 7 (Nichols K, 2003).

**Figura 14.  $^1\text{H}$ -RMN de la glomalina purificada usando las columnas de fenil y lectina, deglicosilada y separando la fracción de oligosacáridos (a) y de proteína (b).**



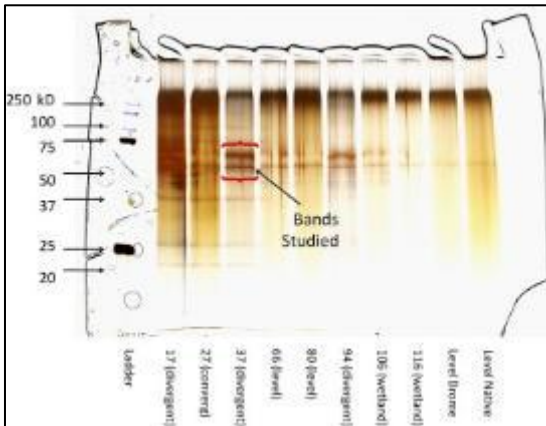
Fuente: Nichols K, 2003.

**Tabla 7. Identificación de grupos funcionales de la glomalina según el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN**

Desplazamiento químico (ppm)	Grupos funcionales
0,8	Amino ácidos: valina, isoleucina y leucina
Menor de 1,0	Metilos ( $\text{CH}_3$ )
1,0-2,0	Metilenos ( $\text{CH}_2$ )
2,0-2,5	Metinos y metilenos (ej: $\text{CH-N}$ , $\text{CH}_2\text{-N}$ , $\text{CH-C=O}$ , $\text{CH}_2\text{-C=O}$ )

En el 2011 Gillispie et al., realizaron la extracción del GRSP de suelos seleccionados de Saint-Denis en el norte de Paris. Este extracto fue sometido a electroforesis de proteínas y a espectrometría de masas. El análisis por SDS-PAGE mostró entre 2 y 4 bandas entre 55 y 65 kDa (Figura 15).

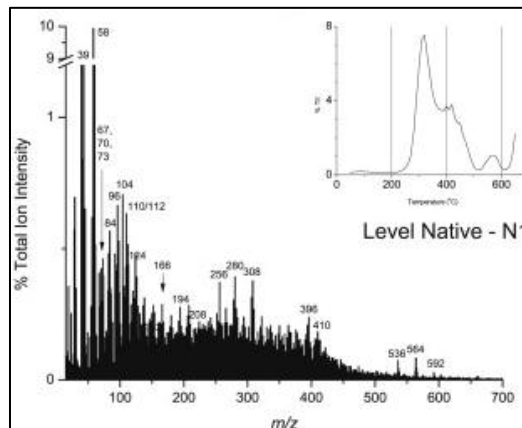
**Figura 15. Análisis del extracto de GRSP por SDS-PAGE. Gel teñido con plata coloidal.**



Fuente: Análisis realizado por Gillespie et al., 2011

El análisis por espectrometría de masas (Figura 16) mostró abundantes señales para proteínas/péptidos ( $m/z$  58, 59, 70, 73 y 84) y señales menos abundantes para carbohidratos ( $m/z$  84, 96, 110, 112, 113).

**Figura 16. Pirolisis de ionización en campo- Espectroscopia de masas**

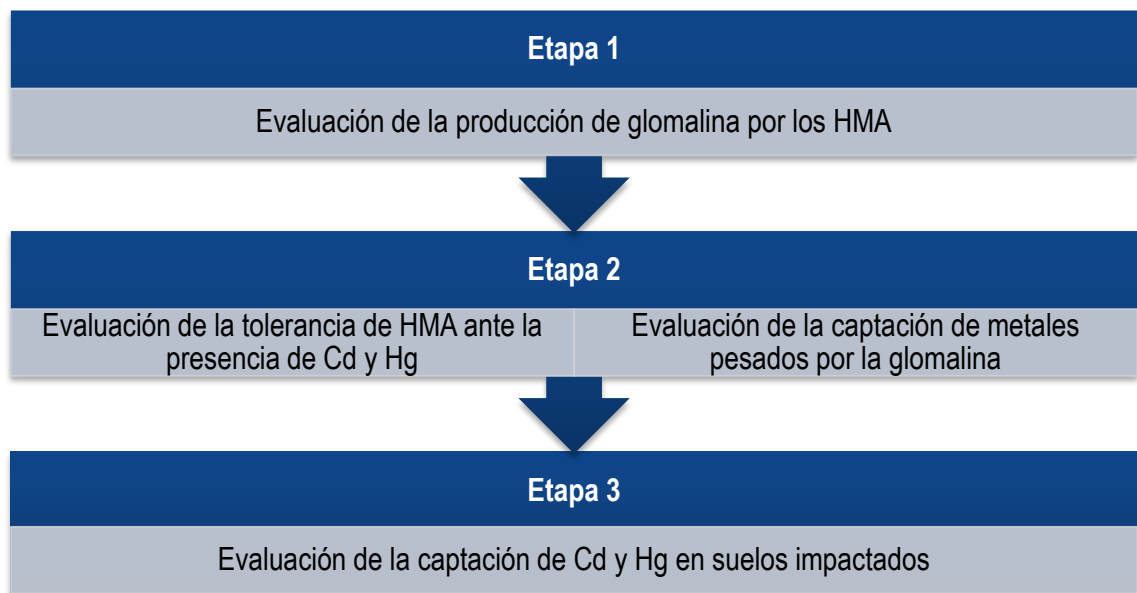


Fuente: Análisis realizado por Gillespie et al. (2011)

En el año 2006 Gadkar V y Rillig M. realizaron secuenciación parcial de una banda de proteína de reactividad cruzada con el anticuerpo específico para glomalina MAb32B11 de *Glomus intraradices*, con lo cual se encontró que una secuencia de 17 aminoácidos mostró similitud con la proteína de choque térmico 60 (hsp60). Hoy se sabe que la glomalina es homólogo putativo de la hsp60 (Janos D. et al. 2008).

## 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental se llevó a cabo en tres etapas:



### 2.1 ETAPA 1: PRODUCCIÓN DE GLOMALINA (GRSP) POR LOS HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Para la evaluación de la producción de glomalina por HMA se realizaron 10 cultivos monospóricos de *Glomus spp* en suelo artificial estéril (arena estéril), no impactado por metales pesados (como se describe a continuación en la sección 2.1.1). Los cultivos se mantuvieron durante tres meses en invernadero, tiempo necesario para permitir la simbiosis entre la *Brachiaria* y las esporas de *Glomus spp*. Cumplidos los tres meses, en cada cultivo monospórico se realizó

cuantificación de la glomalina (como se describe en la sección 2.1.3) y conteo de esporas (como se describe en la sección 2.1.2).

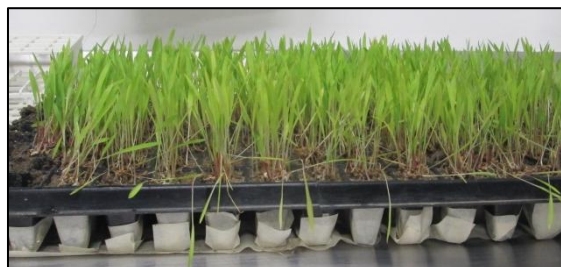
**2.1.1 Cultivos monospóricos de *Glomus* spp.** Los cultivos monospóricos (Figura 17) se realizaron utilizando como planta hospedera plántulas de *Brachiaria decumbens* previamente inoculadas con *Glomus spp* sembradas en macetas de 1L de capacidad, que contenían como sustrato 1Kg de arena estéril.

**Figura 17. Cultivos monospóricos de *Glomus* spp.**



Para el montaje de cada cultivo monospórico se requirió de tres plántulas de *Brachiaria decumbens* con una semana de germinación y desarrollo (Figura 18).

**Figura 18. Germinador con *Brachiaria decumbens* de una semana de germinación y desarrollo**



La germinación de las plantas se llevó a cabo sembrando las semillas superficialmente en el germinador que contenía arena estéril. Los primeros tres días de germinación fue necesario mantener el germinador bajo oscuridad y realizar tres riegos diarios con agua destilada mediante atomización.

Se seleccionó *Brachiaria decumbens* como planta hospedera teniendo en cuenta que esta planta se caracteriza por tolerar extremos de humedad y sequía. Además se adapta a diferentes tipos de suelos incluso a aquellos escasos de nutrientes o infértiles (Nufarm, 2014), características necesarias para el desarrollo del experimento.

La inoculación de las plántulas de *Brachiaria decumbens* con *Glomus spp* se realizó retirando cuidadosamente la plántula del germinador y después de lavar las raíces con agua destilada, se llevó al microscopio estereoscopio donde se inoculó cada plántula directamente en la raíz con 5 esporas de *Glomus spp*, para un total de 15 esporas por cultivo, teniendo en cuenta que en cada cultivo se sembraron tres plántulas (Figura 19).

**Figura 19. Inoculación de *Brachiaria decumbens* con esporas de *Glomus* spp.**



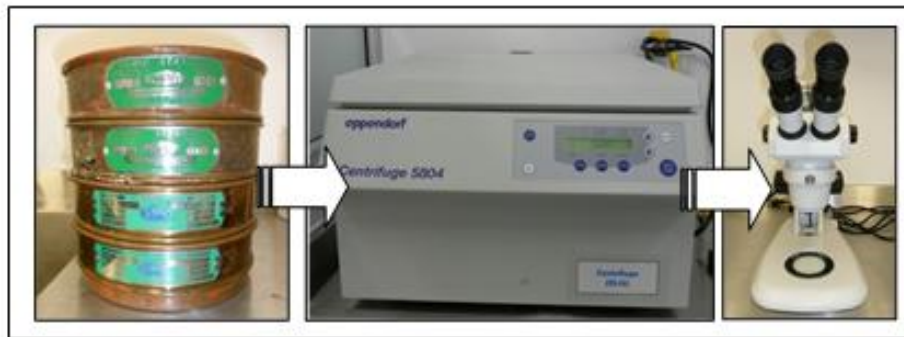
Las esporas de hongos micorrízicos fueron suministradas por el Laboratorio de Biotecnología Agroambiental-LIIBAAM-Grupo de investigación MICROBIOTA de la Universidad de Santander y hace parte de la colección de hongos micorrízicos de suelos tropicales.

Una vez realizados los montajes de los cultivos monospóricos, permanecieron durante el desarrollo de la investigación en el invernadero de la Universidad de Santander donde el microclima mantiene una temperatura aproximada de 25°C y una humedad relativa de 70%. Se realizaron riegos con agua destilada cada 24h de acuerdo a la capacidad de campo del suelo (aproximadamente 150mL).

**2.1.2 Cuantificación de Microorganismos rizosfericos.** Después de permitir la multiplicación de esporas por tres meses en los cultivos monospóricos realizados como se describe en la sección 2.1.1, se determinó por triplicado el número de esporas por gramo de suelo, mediante la técnica de tamizado húmedo

(Gerdemann y Nicolson, 1963), seguido por la centrifugación en sacarosa (Jenkins, 1964). El conteo de esporas se realizó bajo un microscopio estereoscópico (40X) (Figura 20).

**Figura 20. Proceso para realizar el conteo de esporas**



**2.1.3 Extracción y determinación de GRSP.** En cada uno de los cultivos monosporicos realizados como se describió en la sección 2.1.1 se llevó a cabo la extracción de glomalina, tomando 1g de suelo y adicionando buffer citrato 50mM pH 8, luego se llevó a calentamiento durante 1h a 121°C siguiendo el método descrito por Wright y Apadhyaya en 1998 (Cornejo et al. 2008, Nichols K. 2003). Una vez finalizada la extracción se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford a 595nm realizando previamente la curva de calibración con patrones de Albumina de suero bovino (BSA) (Anexo I). (Bradford, 1976).

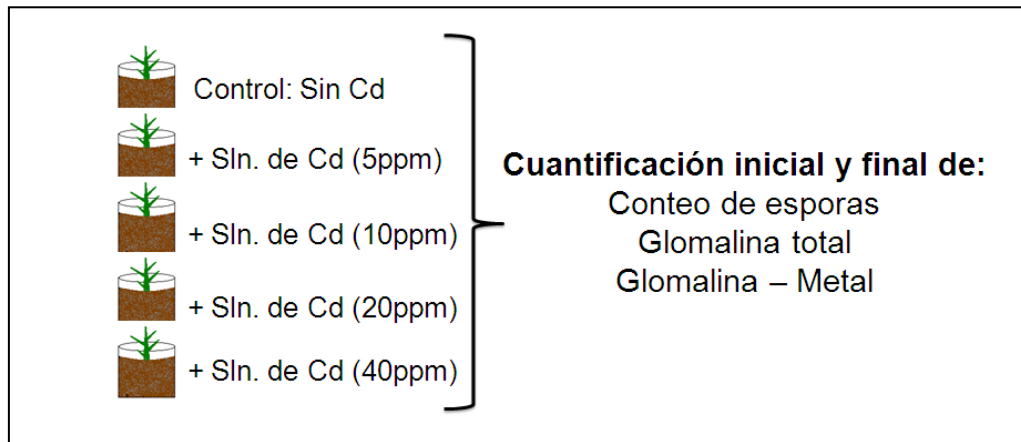
## **2.2 ETAPA 2: TOLERANCIA DE LOS HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES A LOS METALES PESADOS CD Y HG Y CAPTACIÓN DE LOS METALES PESADOS POR LA GLOMALINA**

Después de permitir la simbiosis y la multiplicación de esporas por tres meses en los cultivos monospóricos realizados como se describe en la sección 2.1, se llevó a cabo la evaluación de la tolerancia de las micorrizas ante los metales pesados mediante el estudio de la variación de la esporulación de los hongos y la producción de glomalina antes y después de realizar la contaminación controlada de los suelos.

**2.2.1 Contaminación controlada de los suelos.** La cuantificación de la captación de los metales Cd y Hg por la glomalina se realizó contaminando de la siguiente manera los cultivos monospóricos realizados como se indica en la sección 2.1.1:

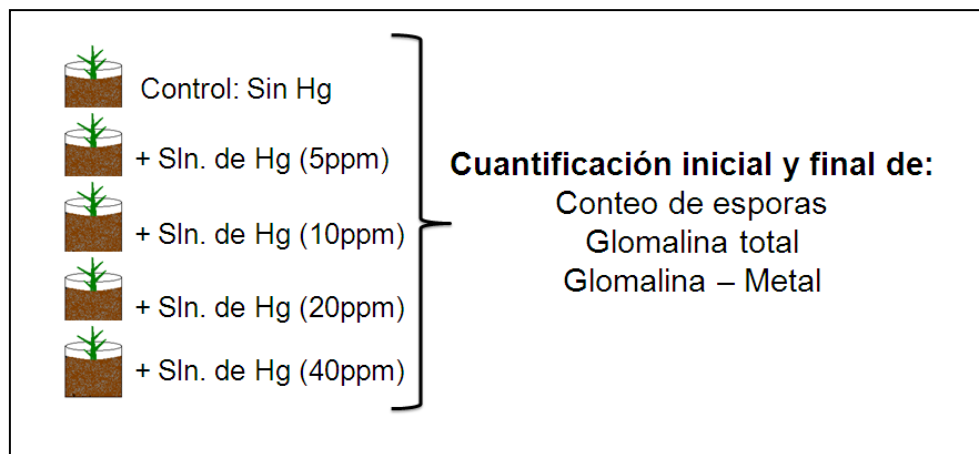
- La contaminación controlada de los cultivos monospóricos con Cd se realizó agregando  $\text{CdSO}_4$  en solución hasta obtener concentraciones de Cd de 5, 10, 20 y 40ppm en cada maceta (Figura 21).

**Figura 21. Metodología de contaminación controlada de suelos y evaluación de la captación de Cd por la glomalina**



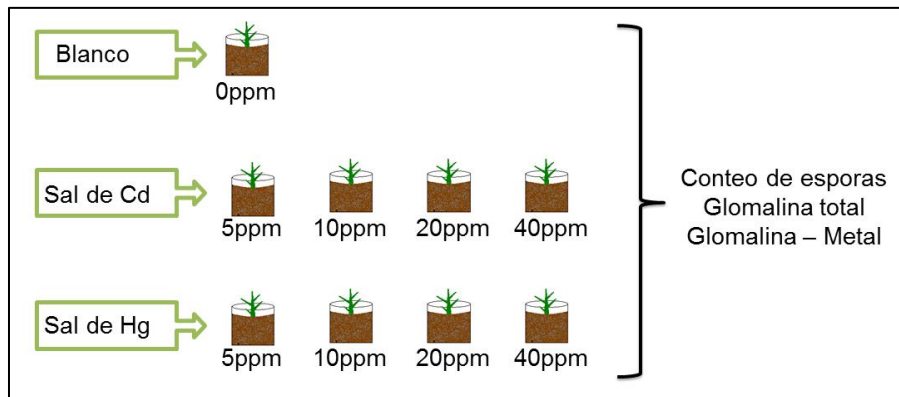
- La contaminación controlada de los cultivos monospóricos con Hg se realizó agregando cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) en solución a cuatro macetas hasta obtener diferentes concentraciones de Hg de 5, 10, 20 y 40ppm en cada maceta, tal como se muestra en la figura 22.

**Figura 22. Metodología de contaminación controlada de suelos y evaluación de la captación de Hg por la glomalina**



En conclusión, para la contaminación controlada se agregó a cada maceta de cultivo monospóricó la sal respectiva partiendo de una solución patrón de 500ppm, adicionando la cantidad necesaria para obtener las concentraciones en el suelo establecidas para el experimento (figura 23). Estas concentraciones se seleccionaron teniendo en cuenta en promedio las concentraciones máximas permisibles de estos contaminantes en suelos de países como México, Ecuador, Canadá, Nicaragua y España y las cantidades de contaminantes reportados en algunos estudios de suelos realizados en España, Venezuela, Colombia y Perú (Huerta H, 2010; Decreto 3516 Ecuador, 2003; Navarrete O, 2010; Vásquez-Alarcón et al., 2005).

**Figura 23. Ensayos en suelo artificial de tolerancia de las micorrizas a los metales pesados**



Una vez contaminados los suelos, se determinó mediante Absorción atómica (como se describe en las secciones 2.2.5 y 2.2.6) el contenido de metal en cada maceta para verificar que los suelos fueron contaminados con las concentraciones deseadas y posteriormente se dejaron en reposo por dos meses haciendo riegos diarios con agua destilada mediante atomización evitando lixiviaciones y permitiendo una dispersión del contaminante en toda la maceta. Pasado este

tiempo se tomó muestra de los diferentes experimentos para evaluar por quintuplicado en cada maceta: conteo de esporas, contenido de glomalina total y glomalina unida a cada metal.

**2.2.2 Conteo de esporas.** En cada maceta de los cultivos monospóricos realizados como se indicó en la sección 2.1.1 se llevó a cabo el conteo de esporas antes de la contaminación controlada y dos meses después de contaminar el suelo, mediante la extracción de las esporas por tamizado en húmedo (tamices de tamaño de poro de 40 a 500  $\mu\text{m}$ ), seguido por la extracción con sacarosa tal como se describe en la sección 2.1.2.

**2.2.3 Contenido de glomalina total.** La evaluación del contenido de glomalina total en cada una de las macetas se realizó antes de la contaminación controlada y dos meses después de contaminar el suelo, mediante la extracción por el método de Wright y Apadhyaya en 1998 y la cuantificación de la GRSP por el método de Bradford, tal como se describe en la sección 2.1.2.

**2.2.4 Cuantificación de GRSP-Metal (Metal unido a la glomalina).** La cuantificación del metal atrapado por la glomalina en cada una de las macetas de los cultivos monospóricos realizados como se describe en la sección 2.1.1, se realizó por espectroscopia de absorción atómica, luego de la precipitación con HCl 1M hasta pH 2.1 y la digestión ácida de la GRSP con  $\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}/\text{HNO}_3$ : 8/1/1 siguiendo la metodología propuesta por Cornejo et al. (2008).

**2.2.5 Determinación del contenido de mercurio.** Se realizó la determinación de la concentración total de mercurio en cada una de las macetas contaminadas con mercurio y en la muestra blanco (cinco macetas: una muestra blanco, una maceta contaminada con Hg al 5ppm, una con Hg a 10ppm, una con Hg al 20ppm y una con Hg a 40ppm) mediante Espectroscopia de absorción atómica con Generador de hidruros a una longitud de onda de 253.7nm con una lámpara de 3mA, tal

como se indica en los estudios realizados por Astudillo et al. (2008) y Carrasquero A. et al. (2002). Este análisis se realizó en el Laboratorio de consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander

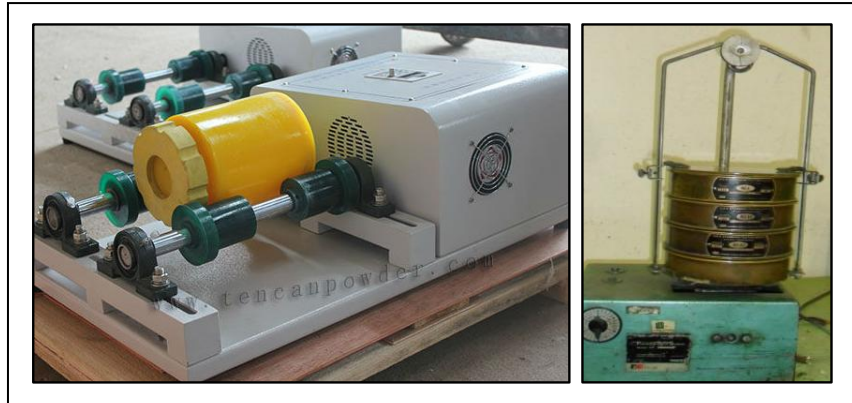
**2.2.6 Determinación del contenido de cadmio.** Se realizó la determinación de la concentración total de cadmio en la muestra blanco (maceta sin contaminar) y en cada una de las macetas contaminadas con cadmio (una maceta con Cd al 5ppm, una con Cd a 10ppm, una con Cd al 20ppm y otra macetas con Cd a 40ppm) mediante Espectroscopia de absorción atómica con una lámpara de cadmio de 5mA a una longitud de onda de 228.8nm tal como lo expresa Netto F et al. 2008 en sus estudios.

### **2.3 ETAPA 3: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIORREMIADORA DE LA GLOMALINA EN SUELOS IMPACTADOS**

Se tomaron muestras de un suelo de cultivo de cacao del municipio de Lebrija-Santander, el cual está impactado con Cd, suministrado por CORPOICA y de dos suelos impactados con Hg de la región minera de California-Santander, suministrados por la empresa minera AUX.

Inicialmente a cada una de las muestras se le realizó un análisis físico-químico para establecer las condiciones de partida, las diferentes muestras de suelo (plataforma, vichacha y cacao) fueron secadas a temperatura ambiente durante 24 h, pulverizadas en un molido de bolas con esferas de vidrio de 1.2cm de diámetro y tamizadas a través de un tamiz de 250 $\mu$ m (malla No. 60) (Figura 24) como parte de la preparación de la muestra necesaria para llevar a cabo el análisis fisicoquímico de cada suelo.

**Figura 24. Molienda y tamizaje de suelos**



Luego se sembró en cada muestra *Brachiaria decumbens* inoculada con micorriza para observar durante tres meses el comportamiento de la esporulación de los HMA, la variación en el contenido de glomalina total y de la captación de metal por la glomalina.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 3.1 CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS

Después de 90 días de haber montado los cultivos monospóricos, tiempo necesario para permitir la simbiosis entre la *Brachiaria* y los HMA, se determinó por triplicado el número de esporas por gramo de suelo en cada cultivo monospórico siguiendo la metodología descrita en la sección 2.1.2.

**Tabla 8. Conteo de esporas en cultivos monospóricos (#esporas/g suelo)**

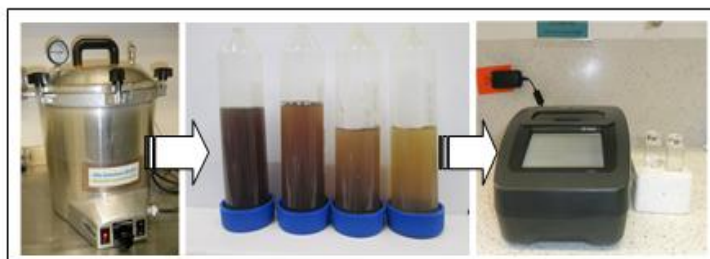
No. Muestra	Conteo de esporas (esporas/g suelo)
1	3,20±0,43
2	2,08±0,21
5	3,20±1,00
8	4,62±1,25
10	2,97±0,19
14	2,77±0,02
16	1,56±0,11
18	3,40±0,87

A pesar de que todos los cultivos monospóricos se iniciaron en la misma fecha y fueron mantenidos en las mismas condiciones medio ambientales, es normal encontrar variaciones entre ellos debido a las diferencias naturales que pueden existir entre el comportamiento de microorganismos de la misma especie y subespecie.

### 3.2 PRODUCCIÓN DE GLOMALINA (GRSP) POR LOS HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

La extracción de glomalina total en el suelo de cada cultivo monospórico se realizó partiendo de una muestra de 1g de suelo y sometiéndola a cuatro ciclos de extracción (figura 25), obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 9, que varían desde 1,79 hasta 10,73 mg/g suelo.

**Figura 25. Procedimiento para extracción y cuantificación de GRSP**



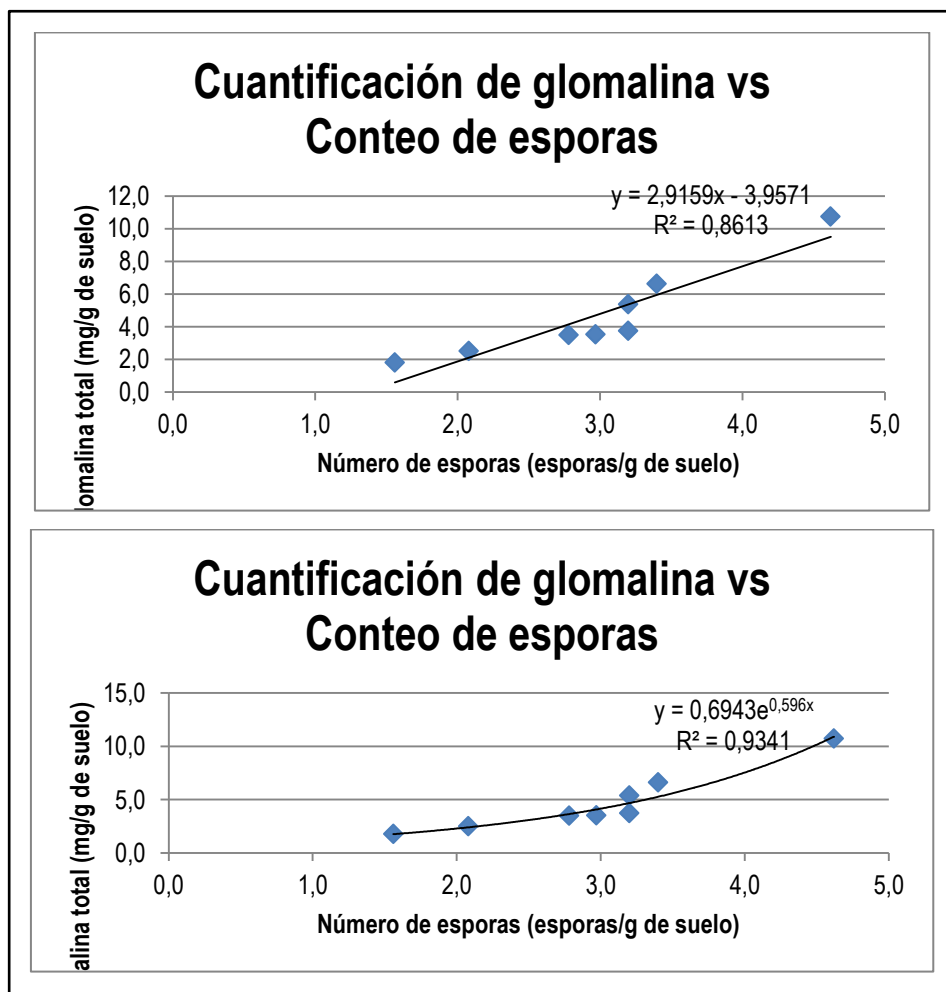
**Tabla 9. Cuantificación de glomalina en cultivos monospóricos**

Muestra	Glomalina total (mg GT/g suelo)
1	3,742 ± 0,0219
2	2,497 ± 0,0049
5	5,368 ± 0,0187
8	10,727 ± 0,0248
10	3,528 ± 0,0133
14	3,492 ± 0,0168
16	1,790 ± 0,0099
18	6,625 ± 0,0319

### 3.3 RELACIÓN ENTRE NÚMERO DE ESPORAS Y EL CONTENIDO DE GLOMALINA TOTAL

La relación entre el número de esporas y el contenido de glomalina total muestra que al aumentar el número de esporas, aumenta proporcionalmente la producción de glomalina. Siguiendo un crecimiento que según el valor de  $r^2$  se ajusta a un modelo exponencial (Figura 26).

Figura 26. Relación entre el número de esporas y el contenido de glomalina total



**Tabla 10. Relación entre el número de esporas y el contenido de glomalina total de cultivos monospóricos**

Muestra	Conteo (esporas/g suelo)	Glomalina total (mg GT/g suelo)
16	1,56	1,791
2	2,08	2,497
14	2,78	3,492
10	2,97	3,528
1	3,20	3,742
5	3,20	5,368
18	3,40	6,625
8	4,62	10,727

Los resultados obtenidos indican que hay una relación directamente proporcional entre el número de esporas micorrízicas y la producción de glomalina, siendo mayor la cantidad a mayor densidad de esporas, estos resultados son soportados por el trabajo realizado por Burrows R, (2014), donde se muestra una correlación positiva de la glomalina y la producción de esporas.

### **3.4 CAPTACIÓN DE METALES PESADOS POR LA GLOMALINA**

La captación de Hg y Cd disponible en los suelos de estudio se da mediante biacumulación en la glomalina.

#### **3.4.1 Estudio de la captación de mercurio**

##### **Efecto del mercurio sobre la esporulación**

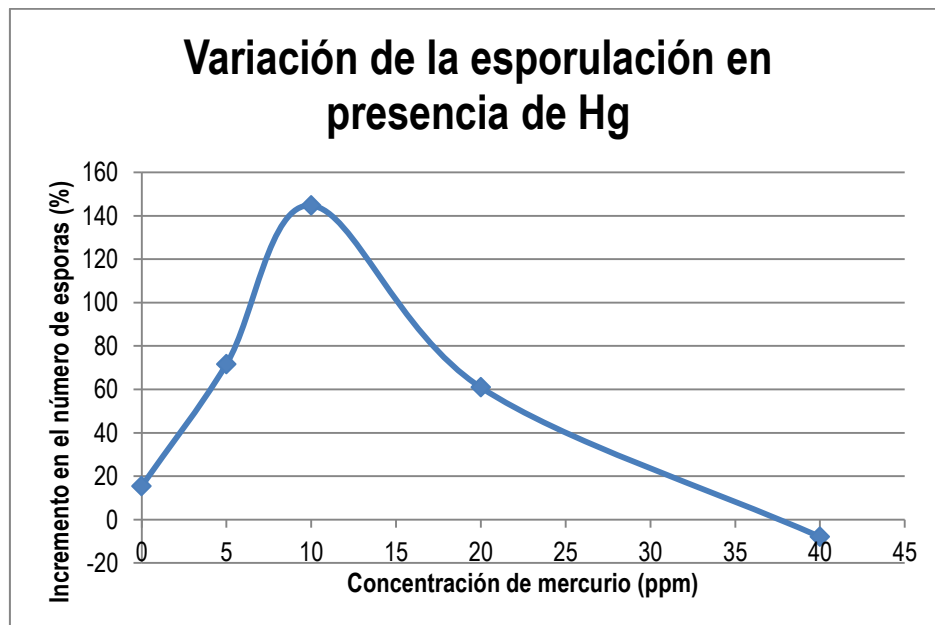
En la tabla 11 se observa la variación del número de esporas al realizar la contaminación del suelo con Hg. Concluyendo que el incremento del número de

esporas es mayor a medida que aumenta la concentración del contaminante en el suelo lo cual demuestra que la producción de *Glomus spp* se ve aumentada ante situaciones de estrés, lo cual es concordante con lo expresado por Singh et al., 2012. Así mismo se observa en la figura 27 que concentraciones muy altas de mercurio inhiben la producción de esporas en el suelo.

**Tabla 11. Variación en el número de esporas antes y después de la contaminación del suelo con Hg**

[Hg] suelo estéril (ppm)	No. Esporas inicial (No/g)	No. Esporas final (No/g)	Incremento No. esporas (%)
0	2,980±0,830	3,440±0,142	15,436
5	2,080±0,824	3,570±0,265	71,635
10	3,400±0,480	8,320±0,351	144,706
20	1,560±0,457	2,510±0,065	60,897
40	2,780±0,686	2,560±0,124	-7,914

**Figura 27. Variación de la esporulación en presencia de mercurio.**



### **Efecto del mercurio en la concentración de glomalina**

En la figura 28 se observa la glomalina precipitada con HCl 0,1M y después de incubación en hielo durante una hora. Esta proteína se caracteriza por el color rojizo que le confiere el hierro que contiene en su estructura.

**Figura 28. Glomalina precipitada mediante tratamiento con HCl 0,1M**



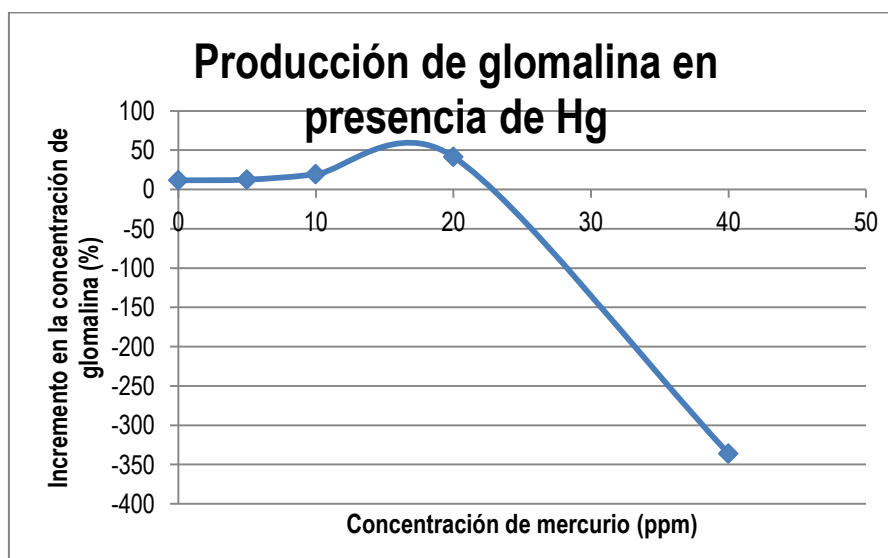
En la tabla 12 y figura 29 se observa que la producción de glomalina aumentó con la concentración de Hg, llegando a un incremento máximo del  $41,503 \pm 0,186\%$  para 20ppm, demostrando que la secreción enzimática, al igual que la multiplicación de esporas, aumenta en situaciones de estrés, tal como lo expresa Singh et al. (2012). A una concentración de 40 ppm de Hg la producción de glomalina disminuyó sugiriendo un nivel de tolerancia por las especies empleadas.

**Tabla 12. Variación en la concentración de glomalina antes y después de la contaminación del suelo con Hg**

[Hg] inicial (ppm)	Glomalina total inicial (mg/g suelo)	Glomalina total final (mg/g suelo)	Incremento Glomalina total (%)	Hg-Glomalina (ppm)	Captación de Hg (%)
0	4,03±0,07	4,56±0,79	11,623	0	0
5	2,50±0,05	2,86±0,11	12,587	0,011±0,002	0,220±0,034
10	6,62±0,32	8,21±0,38	19,367	1,075±0,031	10,750±0,314
20	1,79±0,10	3,06±0,09	41,503	3,980±0,163	19,900±0,815
40	3,49±0,17	0,80±0,06	-336,250	2,860±0,163	7,150±0,407

A 40ppm se evidencia una desnaturalización de proteínas, lo cual ocurre cuando las proteínas se encuentran en solución a pH superiores a su punto isoeléctrico, ya que son capaces de reaccionar con diferentes metales pesados formando los correspondientes proteínados insolubles, tal como lo expresa Mancilla et al., (2009). En este caso, los suelos mantienen un pH entre 4 y 6, valor superior al punto isoeléctrico de la glomalina, determinado como 2.1.

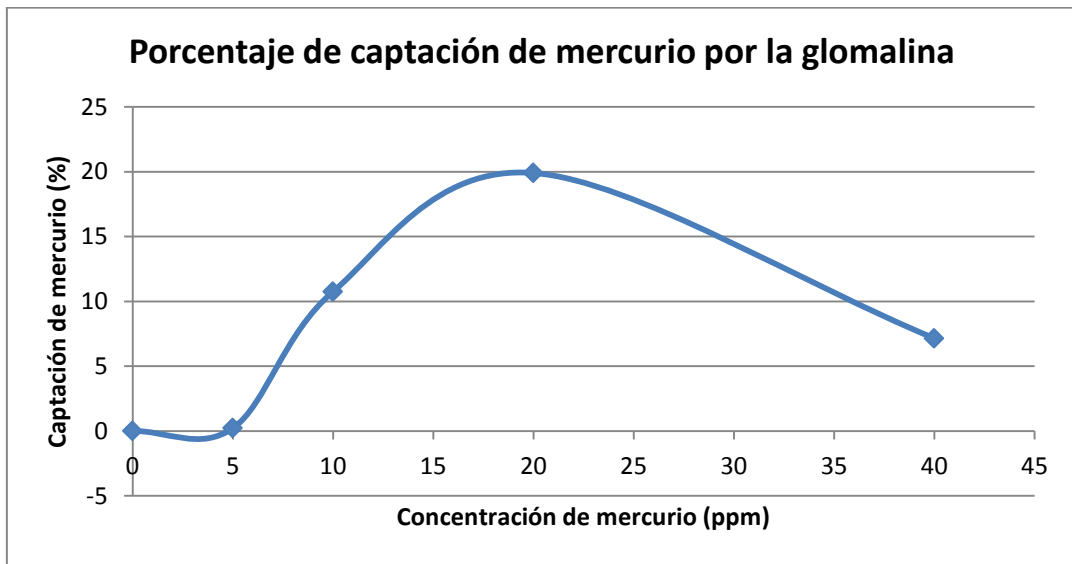
**Figura 29. Producción de la glomalina en presencia de mercurio.**



### Porcentajes de captación de mercurio por la glomalina

A medida que el suelo favorece el incremento de la glomalina, también favorece la captación del metal por la proteína. En la tabla 12 y en las figuras 30 y 31 se puede observar que la captación de mercurio aumenta al aumentar la concentración de contaminante en el suelo y que concentraciones superiores a 25ppm ocasionan una desnaturalización de la proteína que claramente afecta la captación del metal. La desnaturalización se puede apreciar porque la concentración de glomalina final es mucho menor que la inicial, a 40ppm la concentración de glomalina inicial es de 3,49mg de GRSP/g suelo y la final de 0,8mg de GRSP/g suelo.

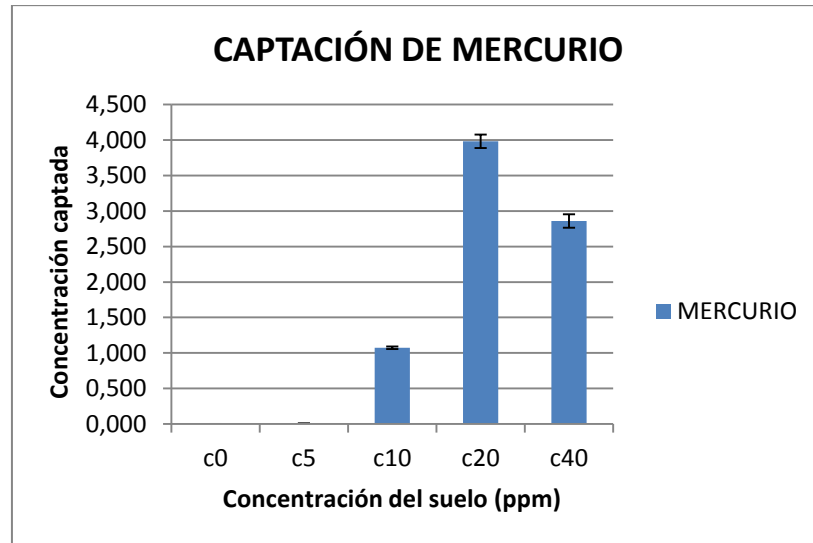
**Figura 30. Porcentaje de captación de mercurio por la glomalina**



Mediante absorción atómica se evidenció una captación máxima de mercurio por la glomalina del  $10,750 \pm 0,314\%$  y  $19,900 \pm 0,815\%$  para 10 y 20ppm respectivamente, evidenciando que la glomalina es una proteína que puede captar mercurio para contribuir a la biorremediación del suelo. Estos resultados son

comparables con los obtenidos por Cornejo et al. (2008) y Gonzalez-Chavez et al. (2004), quienes mostraron que la glomalina contribuye a la captación de Cu y Zn captando entre 7,2 y 35% del metal contaminante.

**Figura 31. Captación de mercurio por la glomalina**



### 3.4.2 Estudio de la captación de cadmio

#### Efecto del cadmio sobre la esporulación

Se evaluó el conteo de esporas antes de la contaminación con cadmio (No. Esporas inicial) y tres meses después de la adición del contaminante (No. Esporas final). En la tabla 13 se observa que la variación del número de esporas en el suelo relacionada con el aumento de la concentración del cadmio no sigue un patrón definido.

**Tabla 13. Esporulaci3n en presencia de diferentes concentraciones de Cadmio**

[Cd] inicial (ppm)	No. Esporas inicial (No/g)	No. Esporas final (No/g)	Incremento de No. esporas (%)
0	2,980±0,190	3,440±0,141	15,436
5	3,200±0,435	3,080±0,096	-3,750
10	2,970±0,190	3,360±0,232	13,131
20	4,620±1,255	3,750±0,109	-18,831
40	3,200±0,999	3,310±0,080	3,438

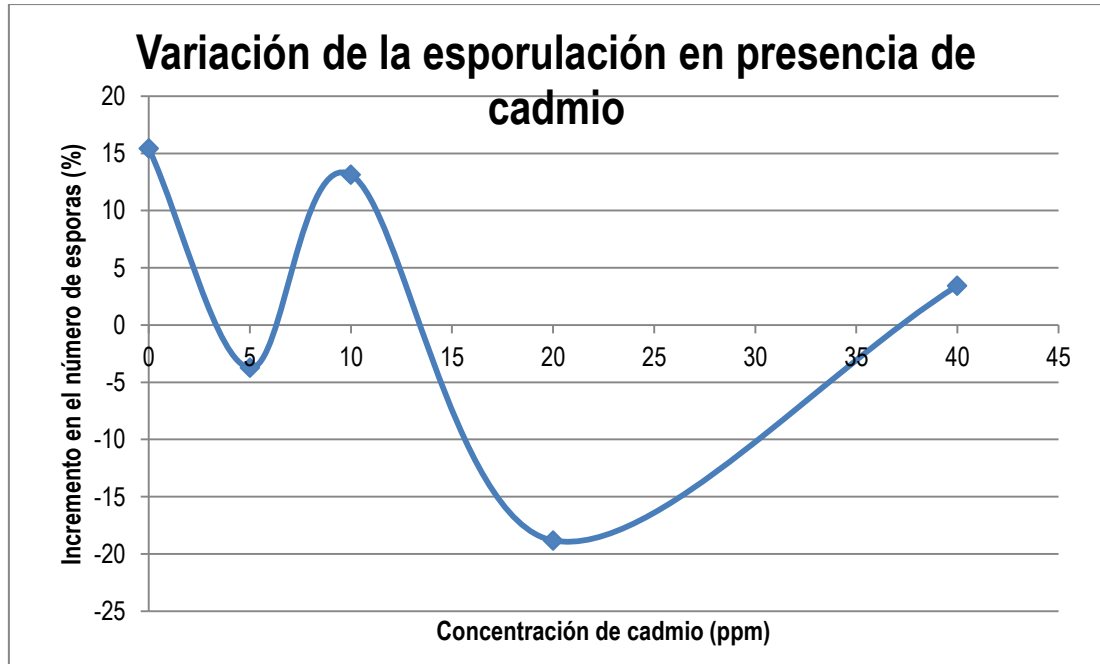
En la figura 32 se observa que la presencia de cadmio en el suelo inhibe la esporulaci3n ya que en todos los casos se obtiene o una disminuci3n en el n3mero de esporas o un incremento inferior al mostrado por el blanco.

Sin embargo en la tabla 14 se puede apreciar que la inhibici3n en la esporulaci3n no inhibe la producci3n de glomalina, lo que supone que los hongos micorr3zicos pueden exudar la prote3na sin necesidad de esporular.

La inhibici3n de la esporulaci3n es debida al efecto antimic3tico que causan algunos metales pesados, entre ellos el cadmio, los cuales han sido ampliamente utilizados en farmacolog3a para tratamientos contra hongos dermatol3gicos (Urdanivia J, 2013. Arag3n M y Benedi J, 2004).

Adicionalmente, las sales de cadmio han sido utilizadas para el tratamiento de enfermedades mic3ticas que afectan el c3sped y la corteza de los huertos de 3rboles, actualmente estos fungicidas son comercializados como gen3ricos ya que los fungicidas derivados del cadmio se encuentran fuera de circulaci3n (EPA, 2013).

**Figura 32. Variación de la esporulación en presencia de cadmio.**



### **Efecto del cadmio en la concentración de glomalina**

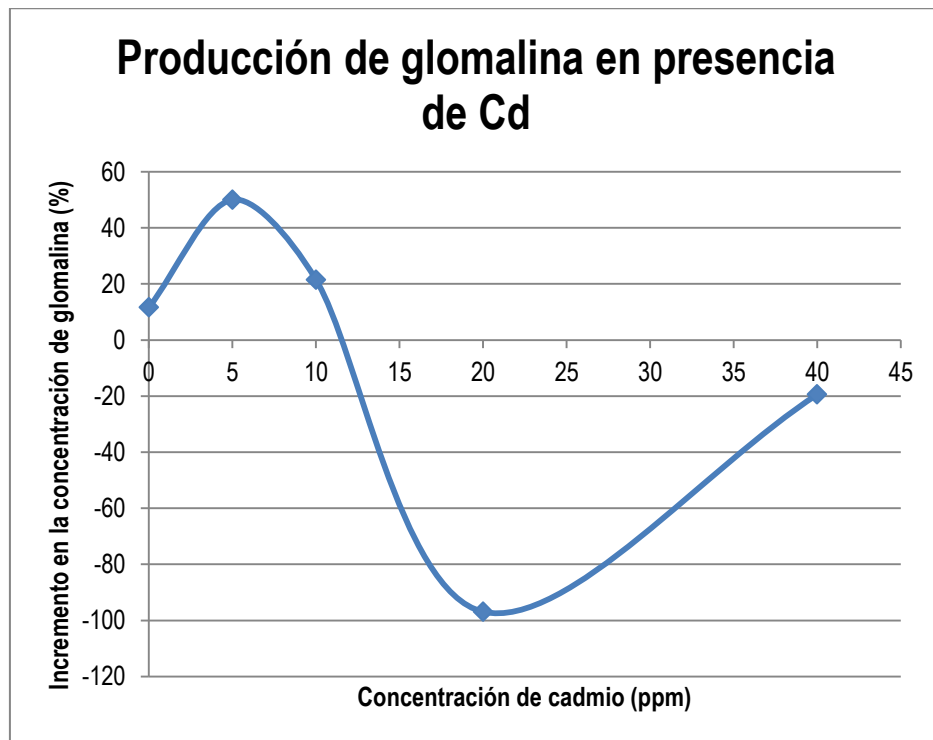
En la tabla 14 se observa que en las muestras contaminadas con 5 y 10ppm de cadmio se da un aumento en la concentración de glomalina al transcurrir tres meses, evidenciando que estas concentraciones no son perjudiciales para la producción de la proteína, por el contrario el incremento es mayor que en el blanco, con lo cual una vez más se puede concluir que situaciones de estrés pueden aumentar los niveles de glomalina en el suelo.

En las muestras contaminadas con concentraciones de cadmio de 20 y 40ppm se observa desnaturalización de la proteína posiblemente formando proteínas insolubles.

**Tabla 14. Variación en la concentración de glomalina antes y después de la contaminación del suelo con Cd**

[Cd] (ppm)	Glomalina total inicial (mg/g suelo)	Glomalina total final (mg/g suelo)	Incremento Glomalina total (%)	Cd-Glomalina (ppm)	Captación de Cd (%)
0	4,030±0,072	4,560±0,790	11,623	0,000	0,000
5	3,742±0,219	7,490±0,190	50,043	2,000±0,053	40,000±1,058
10	3,528±0,133	4,490±0,140	21,500	6,000±0,181	60,000±1,808
20	10,727±0,248	5,450±0,190	-96,912	17,700±1,495	88,500±7,476
40	5,368±0,187	4,490±0,340	-19,441	32,400±2,095	81,000±5,237

**Figura 33. Producción de la glomalina en presencia de cadmio**



### Porcentajes de captación de cadmio por la glomalina

En la tabla 14 se observan los resultados de los porcentajes de captación de cadmio por la glomalina. Los porcentajes son mayores que para el mercurio, por tanto se puede afirmar que la glomalina tiene preferencia por el cadmio.

No se aprecia una relación entre la cantidad final de glomalina y el porcentaje de captación pero si entre la concentración de cadmio y el porcentaje de captación. Obteniéndose mayor captación a concentraciones altas de contaminante, debido a la mayor disponibilidad de metal para ser atrapado por la proteína.

A 40ppm disminuye la captación debido a la desnaturalización de la proteína en presencia de metales pesados que en ocasiones puede causar una precipitación.

Figura 34. Porcentaje de captación de cadmio por la glomalina

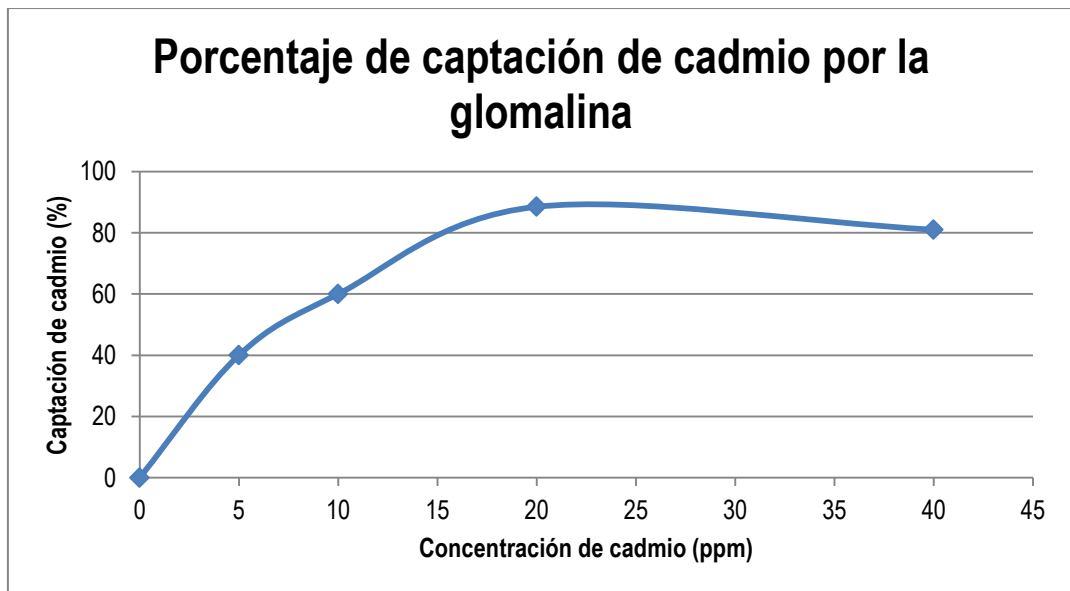
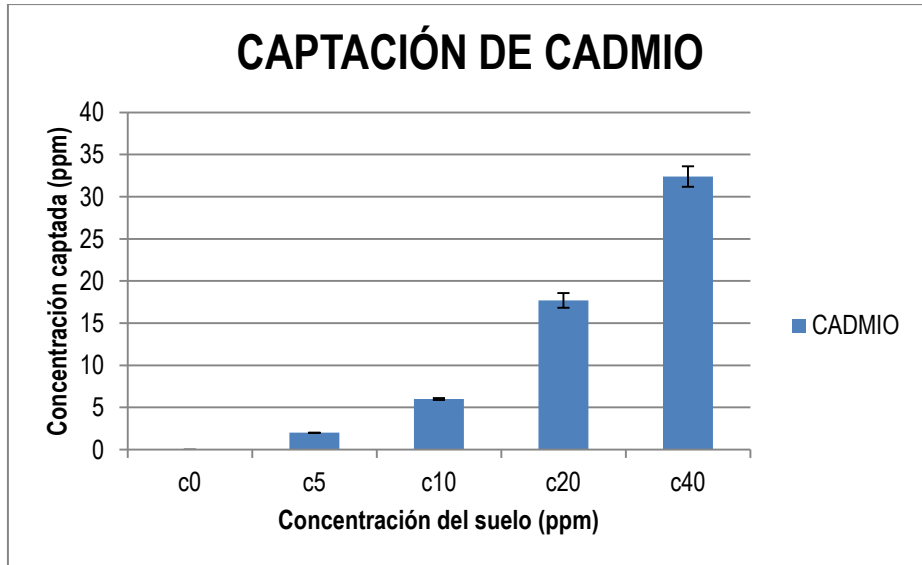


Figura 35. Captación de cadmio por la glomalina



### 3.5 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIORREMIADORA DE LA GLOMALINA EN SUELOS IMPACTADOS

Se evaluaron tres suelos. Dos muestras de la zona minera de California-Santander, donadas por la empresa minera AUX, las cuales están designadas como (i) Vichacha, nombre vulgar del agraz silvestre (*Vaccinium meridionale*), tomada de un cultivo endémico y (ii) Plataforma, tomada de la zona de tratamiento al metal extraído de la mina. El tercer suelo fue donado por CORPOICA, tomado de un cultivo de cacao contaminado con cadmio.

**Figura 36. Vichacha *Vaccinium meridionale*)**



Fuente: Medina C. (2009)

Los suelos naturales contaminados con Cd y Hg de Lebrija y de la zona minera de California-Santander, se inocularon en la raíz con quince esporas de *Brachiaria decumbens*, para favorecer la multiplicación de las esporas ya existentes en el suelo, las muestras se mantuvieron tres meses bajo condiciones de invernadero con el fin de permitir la simbiosis.

Pasados los tres meses, se realizó el conteo de esporas. Los resultados se relacionan en la tabla 15. Donde se puede observar que el suelo de plataforma presenta menor incremento en el número de esporas comparado con el incremento en los suelos de cultivo, esta situación se debe a la carencia de nutrientes del suelo infértil de esta región minera, esta condición es soportada por el trabajo de Hobbie (1992) quien correlaciona la materia orgánica como uno de los parámetros del suelo que afecta la composición de HMA (hongos micorrízicos arbusculares) así también como el pH , los niveles de nutrientes y los contenidos de fenoles.

**Tabla 15. Esporulaci3n en suelos afectados por cadmio y/o mercurio**

Suelo	No. Esporas inicial (No/g)	No. Esporas final (No/g)	Incremento No. esporas (%)
Vichacha	10,04±0,04	13,8±0,83	37,450
Plataforma	16,32±0,26	16,71±0,25	2,390
Cacao	6,85±0,26	10,24±0,09	49,489

Se determin3 la concentraci3n de glomalina en los suelos antes y tres meses despu3s de la siembra de *B. decumbens* inoculada con *Glomus spp*, en todos los casos se observ3 un aumento en la glomalina debido a la proliferaci3n de esporas ya que se hizo posible la simbiosis con la presencia de la ra3z de la *Brachiaria*.

**Tabla 16. Incremento de la glomalina en suelos afectados por cadmio y/o mercurio**

Suelo	Glomalina total inicial (mg/g suelo)	Glomalina total final (mg/g suelo)	Incremento Glomalina total (%)
Vichacha	1,1948±0,0076	2,9691±0,1483	59,758
Plataforma	3,2255±0,1014	3,8126±0,0175	15,399
Cacao	1,6997±0.0038	2,9145±0,0659	41,681

Los porcentajes de captaci3n registrados en la tabla 17 son bajos comparados con los resultados obtenidos en los suelos de cultivos monosp3ricos contaminados artificialmente, esto debido a las interferencias que se encuentran en un suelo real, donde est3n presentes diferentes metales que pueden llegar a competir con el Hg o el Cd por la captaci3n.

**Tabla 17. Captación de cadmio y/o mercurio por la glomalina**

Suelo	Metal captado: M	[M] inicial (ppb)	M-glomalina (ppb)	Captación de M (%)
Vichacha	Hg	179,9±0,3055	3,7±0.1578	2,06
Plataforma	Hg	972,7±3,0806	16,5±1,4799	1,70
Cacao	Cd	1500±10	140±5.7735	9,33

M=Metal de estudio.

[M] inicial=es la concentración del metal en la muestra de suelo extraída de las regiones contaminadas antes de sembrar *B. decumbens* inoculada con esporas en el suelo

Bajo las condiciones evaluadas la glomalina capta mayor cantidad de Cd que de Mercurio. Estos dos metales se encuentran ubicados en el grupo 12 (IIB) de la tabla periódica, por lo tanto presentan propiedades químicas similares; en tamaño, el cadmio es más pequeño que el mercurio, el radio atómico del Cd es 1,54Å y del Hg es 1,57Å; en masa, el mercurio es más pesado, con un peso atómico de 200,6g, mientras el cadmio pesa 112,4.

**3.5.1 Análisis fisicoquímico de los suelos afectados.** En la tabla 18 se observa que el suelo Plataforma presenta mayores niveles de calcio, hierro y zinc, los cuales pueden inhibir la absorción de mercurio, ya que a pH ácidos estos metales se pueden comportar como antagónicos del contaminante en la proteína, tal como lo expresa Navarro G, (2013).

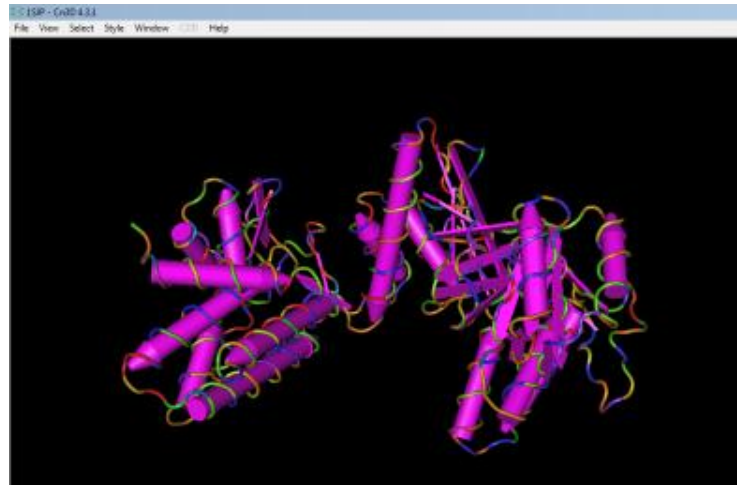
El análisis fisicoquímico arrojó los siguientes resultados:

**Tabla 18. Resultados de análisis fisicoquímico de suelos**

Suelo Parámetro	Suelo cultivo Vichacha	Suelo Plataforma	Suelo Cacao
pH	4.7	5.7	4.6
Ca <sup>+2</sup> (meq/100g suelo)	0.82	6.93	1.46
Mg <sup>+2</sup> (meq/100g suelo)	0.33	3.32	0.46
Na <sup>+</sup> (meq/100g suelo)	0.20	0.33	0.26
K <sup>+</sup> (meq/100g suelo)	0.12	1.32	0.60
Al <sup>+3</sup> (meq/100g suelo)	6.0	-	4.6
CIC (meq/100g suelo)	22.0	23.0	21.0
S (ppm)	5.17	18.9	22.3
B (ppm)	0.13	0.11	0.30
Fe (ppm)	49.9	453	120
Mn (ppm)	1.24	26.5	10.4
Cu (ppm)	9.80	17.44	1.91
Zn (ppm)	3.16	9.20	3.62

**3.5.2 Residuos aminoacidicos posibles captadores de Cd y Hg.** Aún no se conoce la estructura de la glomalina pero los estudios realizados por Gadkar V y Rilling M. 2006 han mostrado que esta proteína es homologo putativo de la proteína de choque térmico (hsp60), a esta homología se le pueden atribuir la resistencia térmica y las características medioambientales de la glomalina (Purin S y Rillig M. 2007).

**Figura 37. Hsp60 (pdb 1SJP) visualizada en Cn3D**

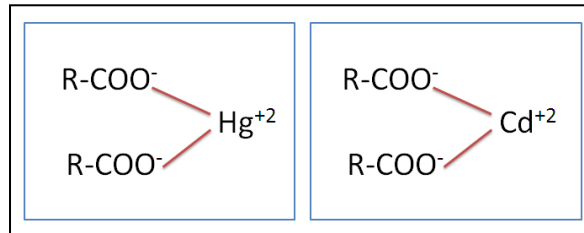


Usando la estructura de la hsp60 (figura 37) como patrón para observar la abundancia de los aminoácidos que pueden realizar la captación del Hg y del Cd en la glomalina, en la figura 39 se señalaron los aminoácidos captadores de metales, con el fin de observar la abundancia de cada aminoácido dentro de la estructura de la proteína, para esto se utilizó el programa visualizador de proteínas Cn3D.

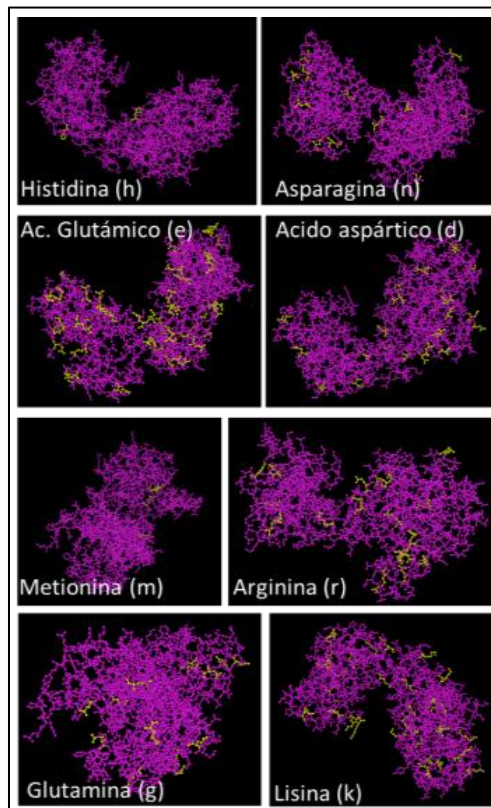
En la Hsp60 los aminoácidos más abundantes con posible capacidad captadora de metales son el ácido glutámico, la lisina y el ácido aspártico seguido por arginina, glutamina y asparagina.

Los cuales se pueden unir a los metales por sus grupos radicales dependiendo de su disposición espacial, mediante interacciones iónicas, formando complejos similares a los de la figura 38.

**Figura 38. Interacciones iónicas entre los grupos carboxilo libres de las proteínas y los metales Cd y Hg**



**Figura 39. Aminoácidos captadores de metales. En color amarillo se señalan los aminoácidos indicados en cada recuadro. Visualizada en Cn3D**



#### 4. CONCLUSIONES

- En este trabajo se encontró que la producción de glomalina está directamente relacionada con la densidad de esporas de hongos micorrízicos hallados en cultivos monospóricos. Sin embargo, el modelo puede cambiar y verse afectada la densidad de esporas por factores ambientales como la presencia de altas concentraciones de metales pesados o por los mismos estados fisiológicos de las esporas como lo es el estado de dormancia, tal como lo expresan Tresender K, y Turner K (2007).
- En presencia de mercurio el número de esporas aumenta con el aumento de la concentración del contaminante, situación que concuerda con lo reportado por Sing (2012), quien afirma que la producción de *Glomus spp* se ve aumentada ante situaciones de estrés aunque en este trabajo se obtuvo que concentraciones de mercurio superiores a 20ppm ocasionan una inhibición en la esporulación.
- La producción de glomalina en presencia de mercurio, disminuye apreciablemente a concentraciones superiores a 20ppm de Hg.
- La glomalina bajo las condiciones del experimento (suelo artificial (arena esteril), microclima de invernadero con temperatura aproximada de 25°C y un número limitado de esporas) tiene la capacidad de captar hasta un 20% del mercurio presente en el suelo. Estos resultados son de gran interés para el desarrollo de tecnologías de biorremediación ya que son comparables con los resultados obtenidos empleando otras técnicas de remediación más costosas y menos beneficiosas, como la fitoextracción y la electroremediación (Beltrán M, 2011. Vidal J, et al. 2011. Garcia L. et al. 2011).

- De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se observó que el Cd no aumenta la esporulación en el medio, por el contrario, se comporta como un inhibidor de esporas, debido a sus características antimicóticas.
- En este trabajo se encontró que en suelos contaminados con cadmio tiende a aumentar la captación de cadmio con el incremento de la glomalina y de la concentración de contaminante en el suelo.

## 5. RECOMENDACIONES

1. Para mejorar los porcentajes de captación de Hg se recomienda: aumentar la cantidad de esporas implantadas en el suelo, teniendo en cuenta que al aumentar el número de esporas aumenta la concentración de glomalina en el suelo. Además se debería realizar un estudio con variación de pH y del contenido de materia orgánica, ya que según lo expresado por Pérez A, et al., (2011) estos son parámetros que afectan la composición de HMA en el suelo.
2. Evaluar el método empleando suelos contaminados con concentraciones de mercurio inferiores a 20ppm, ya que en los suelos de la región minera de California-Santander se encontró un nivel máximo de Hg de 1ppm y para continuar trabajando en la biorremediación de suelos de esta zona, es necesario evaluar el comportamiento de la glomalina a concentraciones de Hg inferiores a las estudiadas en este trabajo.
3. Realizar las pruebas de captación empleando soluciones, mezclando una solución de proteína con una solución de contaminante, esto con el fin de verificar los resultados obtenidos y conocer si hay interferencias en la captación por las sustancias presentes en el suelo o pérdida de contaminante por causas externas como el riego de las plántulas.
4. Partir de suelos con igual número de esporas o realizar los ensayos en suelos con igual concentración de glomalina inicial.
5. Realizar estudios para elucidar la estructura de la glomalina y así poder comprender mejor los sitios de la proteína encargados de la captación de metales. Estos estudios deben iniciar con una purificación de la proteína para

su posterior secuenciación.

6. Cuantificar la GRSP por el método de ELISA utilizando el anticuerpo monoclonal MAb 32B11, específico para glomalina ya que según Burrows R, (2013) con esta técnica se obtienen mejores resultados que realizando la cuantificación por el método de Bradford.

## BIBLIOGRAFÍA

ABDUL K. (2006) Mycorrhizoremediation an enhanced form of phytoremediation. Journal of Zhejiang University SCIENCE B. 7: 503-514.

ACOSTA M y MONTILLA J. (2011) Evaluación de la contaminación por Cadmio y plomo en agua, suelo y sedimento y análisis de impactos ambientales en la subcuenca del río Balsillas afluente del río Bogotá. Universidad de la Salle. Facultad de ingeniería. 157pp

ALICES-VILLANUEVA H. (2009) Bioquímica: Proteínas y Aminoácidos. Universidad Interamericana de Puerto Rico.

ARAGÓN M. y BENEDI J. (2004) Antimicóticos dermatológicos. Farmacia Profesional. 18:38-49. Disponible en: <http://www.elsevierciencia.com/es/revista/-/articulo/antimicoticos-dermatologicos-13064579>

ARS, Don Comis. (2002) Glomalin, Hiding place for a Third of the world's stored soil carbon. Agricultural Research. 4-7

ATSDR. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (2008) Resumen de Salud Pública: Cadmio. Disponible en: [http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs5.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs5.html)

ATSDR. Agency for toxic substances y disease registry. (2011) Cadmio. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=15>  
Batista R y Sánchez A. (2009) Fitorremediación de metales pesados y microorganismos. R electrónica de la agencia de medio ambiente. 16: 1-5.

BELTRÁN M. (2010) Fitoextracción de suelos contaminados con Cd y Zn usando especies vegetales comestibles. División de ciencias básicas e ingenierías. Universidad Autónoma metropolitana de México.

BORIE F, RUBIO R, MORALES A. (2008) Arbuscular mycorrhizal fungi and soil aggregation. *Journal of soil science and plant nutrition*. 8: 9-18.

BRADFORD M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

BURROWS R. (2013) Glomalin Production and Infectivity of Arbuscular-Mycorrhizal Fungi in Response to Grassland Plant Diversity. *American Journal of Plant Sciences*, 5: 103-111

CARBONELL A, BURLÓ F y MATAIX J. (1995) Arsénico en el sistema suelo-planta. Secretariado de publicaciones. Universidad de Alicante. España. 117pp.

CARRASQUERO A, et al. (2002) Comparación de métodos para el análisis de mercurio en suelos procedentes del callao, estado Bolívar, Venezuela. *Interciencia*. 27: 191-194.

CORNEJO P, MEIER S, BORIE G, et al. (2008) Glomalin-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. *Science of the total environment*. 406: 154-160.

Decreto No. 1594. Ministerio de agricultura. Presidencia de la república de Colombia (1984) Disponible en: [http://www.minambiente.gov.co/documentos/dec\\_1594\\_260684.pdf](http://www.minambiente.gov.co/documentos/dec_1594_260684.pdf)

Decreto N° 3.516: Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados. Presidencia de la república de Ecuador (2003) Disponible en: <http://faolex.fao.org/docs/pdf/ecu112181.pdf>

Dep. de Medicina Legal, toxicología y psiquiatría (2013) Toxicología. Universidad de Granada. Disponible en: <http://www.ugr.es/~ajerez/proyecto/t3-21.htm>

DRIVER J. et al. (2004) Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*. 37: 101-106.

DUQUE G. *Medicina Biológica* (2011), La quelación, una realidad. Disponible en: [http://1medbio.blogspot.com/2011/09/medicina-biologica-dr-german-duque\\_10.html](http://1medbio.blogspot.com/2011/09/medicina-biologica-dr-german-duque_10.html)

Enciclopedia de la salud. La enciclopedia de artículos y respuestas de salud, dietética y psicología. (2013) Disponible en: <http://www.encyclopediasalud.com/definiciones/mercurio>

EPA, United States Environmental Protection Agency. (2013) Capítulo 15. Fungicidas. Disponible en: <http://www.epa.gov/oppfead1/safety/spanish/healthcare/handbook/Spch15.pdf>

FAERRON P. (2007) Diferencias en el patrón de acumulación de glomalina en suelos tropicales asociados con árboles emergentes del bosque y aislados en pastizales. Universidad EARTH. Costa Rica. 45pp.

GADKAR V y RILLING M. (2006) The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative homolog of heat shock protein 60. *Federation of European Microbiological Societies*. 263: 93-101.

GALÁN E y ROMERO A. (2008) Contaminación de suelos por metales pesados. *Macla*. 10: 48-60

GARCÍA L, et al. (2011) Electrorremediación de suelos arenosos contaminados por Pb, Cd y As provenientes de residuos mineros, utilizando agua y ácido acético como electrolitos. *Superficies y Vacío* 24: 24-29

GERDEMANN J. W. and Nicolson T. H. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*. 46.235-244.

GILLESPIE A, et al. (2011) Glomalin-related soil protein contains non-mycorrhizal related heat-stable proteins, lipids and humic materials. *Soil Biology & Biochemistry*. 43: 766-777.

GONZALEZ-CHAVEZ M, CARRILLO-GONZALEZ R, WRIGHT S, et al., (2004) The role of glomalin, a protein produced by arbuscularmycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental pollution*. 130: 317-323.

GONZALEZ-CHAVEZ M. (2005) Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana*. 1: 29-37.

JENKINS W R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Rep*. 48:692, 1964.

HERRERA T. (2001) La contaminación con cadmio en suelos agrícolas. Comité editorial de Venesuelos. Universidad central de Venezuela. 42-47

HIGUERAS P y OYARZUN R. (2004) Universidad de la castilla. Disponible en: [http://www.uclm.es/users/higueras/mga/Tema03/Tema\\_03\\_Suelos\\_3\\_4.htm](http://www.uclm.es/users/higueras/mga/Tema03/Tema_03_Suelos_3_4.htm)

HOBBIE, SE. 1992. Effects of plant species on nutrient cycling. Trends in Ecology & Evolution 7:336- 339.

HUERTA H. (2010) Determinación de propiedades físicas y químicas de suelos con Hg en la región de San Joaquin y su relación con el crecimiento bacteriano. Facultad de Ciencias naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.

JANOS D. et al. (2008) Glomalin extraction and measurement. Soil Biology y Biochemistry. 40: 728-739.

LARA L. (2000) Diversidad y actividad de hongos micorrízicos arbusculares en agrosistemas cafetaleros perturbados por la erosión. Tesis de Maestría en ciencias. Universidad de Colina. 104pp.

LARA M y LOZANO G. Toxicidad del cadmio en plantas (2011). Disponible en: [https://www5.uva.es/guia\\_docente/uploads/2011/450/42234/1/Documento6.pdf](https://www5.uva.es/guia_docente/uploads/2011/450/42234/1/Documento6.pdf)

LENNTECH B.V. (2008) Cadmio. Disponible en: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/cd.htm#ixzz1nyMHovPk>

LENNTECH B.V. (2008) Mercurio. Disponible en: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/hg.htm>

MANCILLA C, et al. (2009) Propiedades químicas y fisicoquímica de las proteínas. Universidad del Valle de México. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/15958125/1-PROPIEDADES-QUIMICAS-Y-FISICOQUIMICAS-DE-LAS-PROTEINAS>

MEDINA C. (2009) Algunas recomendaciones para el manejo del vichacha, motiño o agraz (*Vaccinium meridionales Sw*), como nueva alternativa productiva. Corpoica. Disponible en: [http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Eventos/verevento.asp?id\\_evento=7269](http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Eventos/verevento.asp?id_evento=7269)

MILLÁN R, CARPENA R, SCHMID M, et al. (2007) Rehabilitación de suelos contaminados con mercurio: estrategias aplicables en el área de Almadén. *Ecosistemas*. 16: 56-66

MIRA N. (2011) Cacao colombiano será producto de exportación. Disponible en: [http://www.eltiempo.com/colombia/medellin/ARTICULO-WEB-NEW\\_NOTA\\_INTERIOR-9394725.html](http://www.eltiempo.com/colombia/medellin/ARTICULO-WEB-NEW_NOTA_INTERIOR-9394725.html).

MORALES A, CASTILLO C, RUBIO R, et al., (2006) Niveles de glomalina en suelos de dos ecosistemas del sur de Chile. 37-45.

MUÑOZ F y DELGADO J. (2006) Determinación de mercurio en suelos de Bucaramanga utilizando un pirolizador acoplado a un detector de mercurio basado en espectroscopia de absorción atómica diferencial de Zeeman. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander.

NAVARRETE O. (2010) Aún queda mercurio. *La prensa móvil.com*. Disponible en: <http://m.laprensa.com.ni/reportajes-especiales/127026>

NAVARRO G. (2013) Química Agrícola. Química del suelo y de nutrientes esenciales para las plantas. Tercera edición. Mundi-prensa libros. 508pp

NICHOLS K. (2003) Characterization of glomalin, a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi. University of Maryland. 285pp.

NURFARM. (2014) Brachiaria Decumbens. Disponible en: <http://www.nufarm.com/CO/BrachiariaDecumbens>

OCHOA V, HINOJOSA B, et al. (2007) Actividades enzimáticas como indicadores de calidad del suelo en agroecosistemas ecológicos.

Iniciación a la investigación. Revista electrónica. Universidad de Jaén. 2:1

OLIVERO J y JOHNSON B. (2002) El lado gris de la minería del oro: La contaminación con mercurio en el norte de Colombia. Editorial Universitaria. Universidad de Cartagena. 123pp.

PÉREZ A, et al. (2011) Hongos formadores de micorrizas arbusculares: Una alternativa para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el Caribe Colombiano. Revista Colombiana de Ciencia Animal. 3: 366-385.

PURIN S. y RILLIG M. (2007) The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: Limitations, progress, and a new hypothesis for its function. *Pedobiologia* 51: 123-130.

Química express. (2012) Disponible en: <http://quimica-express.blogspot.com/2012/07/por-que-el-mercurio-se-considera-un.html>

RILLIG M. y STEINBERG P. (2002) Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? *Soil Biology and Biochemistry*. 34: 1371-1374.

RODRÍGUEZ Y, NOVAL B, FERNÁNDEZ F et al. (2004) Estudio comparativo del comportamiento de seis cepas de hongos micorrízicos arbusculares en su interacción con el tomate (*Lycopersicon esculentum* M. var "Amalia"). *Ecología Aplicada*. 3: 162-171.

ROJAS L, PRIN J, NORIEGA J, et al. (2008) Determinación de mercurio en suelos del sector minero las Claritas, estado de Bolívar, mediante procesos analíticos de especiación y microscopia electrónica de barrido (MEB). *Saber*. 20: 342-351.

ROMÁN F. (2003). Concentración de reguladores del desarrollo vegetal inducida por hongos endomicorrízicos en dos cultivares de Chile, Tesis Doctoral, Universidad de Colima.

SAG (Servicio agrícola y ganadero). Ministerio de agricultura de Chile. Metales pesados en el suelo. Disponible en: [http://biblioteca-digital.sag.gob.cl/documentos/medio\\_ambiente/criterios\\_calidad\\_suelos\\_aguas\\_agricolas/pdf\\_suelos/5\\_metales\\_pesados\\_suelo.pdf](http://biblioteca-digital.sag.gob.cl/documentos/medio_ambiente/criterios_calidad_suelos_aguas_agricolas/pdf_suelos/5_metales_pesados_suelo.pdf)

SALAMANCA C, SILVA M. (1998) Micorrizas como alternativa para el manejo sostenible de los agrosistemas tropicales. *Corpoica, Boletín técnico* No.12.

SEGUEL A, RUBIO R, CARRILLO R, et al. (2008) Niveles de glomalina y su relación con características químicas y biológicas del suelo (andisol) en un relicto de bosque nativo del sur de Chile. *Bosque* 29. 1: 11-22.

SINGH et al. (2012) Glomalin: an arbuscular mycorrhizal fungal soil protein. *Protoplasma*. DOI 10.1007/s00709-012-0453-z.

TRESEDER K y TURNER K. (2007) Glomalin in ecosystems. *Soil Science Society of America Journal*. 71: 1257-1266.

URDANIVIA J. Universidad de Santiago de Cali. (2013) Antimicóticos clásicos. Disponible en: <http://www.slideshare.net/juanurdanivia/antimicoticos-clasicos>

VALENCIA C. Universidad Autonoma de México. (2008) Química de suelos o química de coloides. Disponible en: <http://www.agricolaunam.org.mx/edafologia/PAPIME%20APUNTES%20QUIMICA%20DE%20SUELOS/Quimica%2008.pdf>

VASQUÉZ-ALARCÓN A, CAJUSTE L, CARRILLO-GONZÁLEZ R, et al., (2005) Límites permisibles de acumulación de cadmio, níquel y plomo en suelos de Mezquital, Hidalgo. *TERRA Latinoamericana*, 4: 447-455.

VIDAL J, MARRUGO J, JARAMILLO B, et al., (2010) Remediación de suelos contaminados con mercurio utilizando guarumo (*Cecropia peltata*). *Ingeniería y desarrollo*. 27: 113-129.

VIOLI H, BARRIENTOS-PRIEGO A, WRIGHT S, et al. (2008) Disturbance changes arbuscular mycorrhizal fungal phenology and soil glomalin concentrations but not fungal spore composition in montane rainforests in Veracruz and Chiapas, Mexico. *Forest ecology and management*. 254: 276-290.

WRIGHT S, NICHOLS K, SCHMIDT W. (2006) Comparison of efficacy of three extractants to solubilize glomalin on hyphae and in soil. *Chemosphere*. 64: 1219-1224.

## ANEXOS

### ANEXO A. Curva de calibración de Bradford

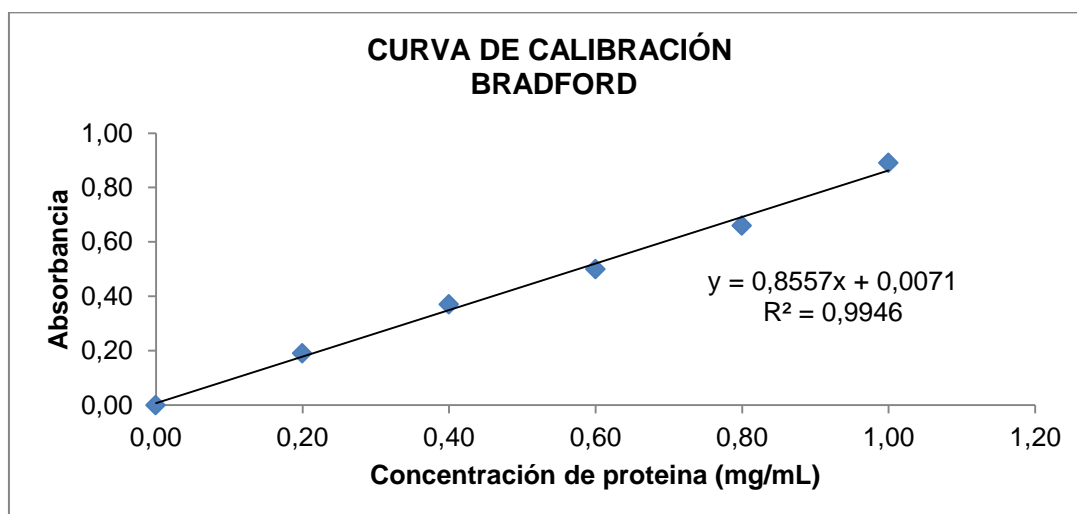


Tabla 2. Datos curva de calibración de Bradford

Concentración de BSA (mg/mL)	Absorbancia
0,00	0,00
0,20	0,19
0,40	0,37
0,60	0,50
0,80	0,66
1,00	0,89

## ANEXO B. Datos estadísticos del Anova

### MERCURIO

Símbolo	Promedio	Desviación	Error Estand	Concentración (ppm)
c0	0,000	0,000	0,000	0
c5	0,011	0,002	0,001	5
c10	1,075	0,031	0,018	10
c20	3,980	0,163	0,094	20
c40	2,860	0,163	0,094	40

### ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR

<i>Grupos</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<b>Desviación</b>	<b>ErrorEstand</b>
c0	5	0,000	0,000	0,000
c5	5	0,011	0,002	0,001
c10	5	1,075	0,031	0,018
c20	5	3,980	0,163	0,094
c40	5	2,860	0,163	0,094

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>p(F)</i>
Entre grupos	37,84	4	9,46	877,04	0,00
DentroGrupos	0,22	20	0,01		
Total	37,95	24			

SC: Suma de cuadrados. GL: Grados de libertad. CM: Cuadrado medio  
 F: Distribución F. p(F): Valor P

## CADMIO

Símbolo	Promedio	Desviación	Error Estand	Concentración (ppm)
c0	0,000	0,000	0,000	0
c5	2,000	0,053	0,031	5
c10	6,000	0,181	0,104	10
c20	17,700	1,495	0,863	20
c40	32,400	2,095	1,210	40

## ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR

Grupos	<i>n</i>	Promedio	Desviación	ErrorEstand
c0	5	0	0,000	0,000
c5	5	2	0,053	0,031
c10	5	6	0,181	0,104
c20	5	17,7	1,495	0,863
c40	5	32,4	2,095	1,210

## ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen	SC	gl	CM	F	p(F)
Entre grupos	2183,78	4	545,946	409,869	0,00
Dentro de los grupos	23,64	20	1,332		
Total	2197,1	24			

SC: Suma de cuadrados. GL: Grados de libertad. CM: Cuadrado medio  
 F: Distribución F. p(F): Valor P

**ANEXO C. Secuencia de aminoácidos de la proteína de choque térmico  
(HSP60), homólogo putativo de la glomalina:**

wgaptitndg vsiakeiele dpyekigael vkevakktdd vagdgtttat vlaqalvreg lnvaaganp  
lgkrgieka vekvtetllk gakevetkeq iaataaisag dqsigdliae amdkvgnegv itveesntfg  
lqltegmrfdkgyisgyf vtdperqeav ledpyillvs skvstvkdl pllekvigag kplliaedv  
egealstlv nkirgfksv avkapfgdr rkamlqdmai ltggqvisee vgltenadl slgkarkvv  
vtdettive gagtdaiag rvaqrqeie nsdsdydrek lqerlaklag gvavikagaa tevelkerkh  
riedavrnak aaveegivag ggvllqaap tldelklegd eatganivkv aleaplqia fnsglepgvv  
aekvrnlpag hglnaqtgvy edllaagvad pvkvtrsalq naasiaglfl tteavvadkp eekasvpgg  
gdmggmdfhh hhhh