



Memoria de resúmenes en Extenso

XV Congreso Internacional Academia Nacional de Ciencias Ambientales | XXI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales “La cultura de los pueblos, base para la conservación del ambiente”

MUSGOS CULTIVADOS, INDICADORES AMBIENTALES DE CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA

[CULTURED MOSSES, ENVIRONMENTAL INDICATORS OF AIR POLLUTION]

María de los Ángeles García-Chávez^{1§}, Ana Marcela Gómez-Hinojos², Nelson Avonce-Vergara³, Graciela Zarazúa-Ortega⁴, Carlos Eduardo Barrera-Díaz⁵

¹Estudiante de posgrado de la Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx), Toluca, México. ²Profesor Investigador-FaPUR-UAEMéx, Toluca, México. ³Profesor Investigador-CIDC-UAEM, Cuernavaca, México. ⁴Investigador-ININ, Toluca, México. ⁵Profesor Investigador-FQ-UAEMéx, Toluca, México. ange_magch@hotmail.com¹ nicemarcelagomez@yahoo.com.mx² nelson.avonce@uaem.mx³ graciela.zarazua@inin.gob.mx⁴ cbd0044@gmail.com⁵. [§]Autor para correspondencia: (ange_magch@hotmail.com).

RESUMEN

Los musgos han demostrado ser muy útiles como bioindicadores de la contaminación del aire. El presente trabajo representa una alternativa a los tipos de monitoreo tradicionales (pasivo y activo), ya que propone evitar la extracción del musgo nativo de los sitios de monitoreo; en su lugar plantea el cultivo *in vitro* del musgo y su posterior exposición en los sitios de monitoreo. El protocolo incluye la identificación de la especie, obtención del esporofito con la cápsula cerrada, la esterilización de la cápsula de esporas con una solución de NaClO. Posteriormente la cápsula se rompe y se liberan las esporas en agua estéril, para ser dispersadas en medio BCD para su cultivo. La incubación de las esporas ocurre a temperatura e intensidad de luz controlada, condiciones que se mantienen constantes hasta que la planta produce gametofitos. Por este método se asegura la obtención de musgo no contaminado para su posterior exposición a la contaminación atmosférica. El biomonitoreo resulta ser un método relativamente económico y fácil de implementar, por lo que es una alternativa viable para ser desarrollada en lugares en donde no se cuente con la infraestructura para monitorear la calidad del aire.

Palabras clave: *Bioindicador, biomonitoreo, calidad del aire, cultivo in vitro.*



Memoria de resúmenes en Extenso

XV Congreso Internacional Academia Nacional de Ciencias Ambientales | XXI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales “La cultura de los pueblos, base para la conservación del ambiente”

ABSTRACT

Mosses have been proven as a highly useful bioindicators for air pollution monitoring. This work describes an alternative to the traditional monitoring strategies (pasive and active) as it proposes to avoid the extraction of native communities of mosses from the monitoring areas. Instead, it aims the *in vitro* cultivation of the moss species and its subsecuent exposition at monitoring areas. This protocol involves the identification of the species, obtainment of sporophytes containing closed spore capsules, sterilization of the capsules using NaClO. Sterilized capsules are broken in sterilized water to release the spores which are spread on BCD media containing plates. Plates containing spores are incubated at controlled conditions (temperature and light intensity) till the gametophyte phase occurs. The use of this methodology assures the obtención of unpolluted plant material to be eventually exposed to pollutants. Biomonitoring is an relatively inexpensive and easy method to implement, therefore it represent an viable alternative to be used in places where there is no infraestructure for monitoring air pollution.

Index words: *Air quality, bioindicator, biomonitoring, in vitro cultured.*

INTRODUCCIÓN

La contaminación atmosférica se ha asociado a diversas enfermedades respiratorias y cardiovasculares (Pan *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Es por ello que hoy en día la calidad del aire es un tema de gran interés, tanto en el aspecto ambiental como de salud (Zarazúa *et al.*, 2013). Sin embargo, el monitoreo convencional de los contaminantes atmosféricos no siempre es posible debido a los costos generados por la adquisición y mantenimiento de los equipos tecnológicos necesarios (Ares *et al.*, 2012; Barandovski *et al.*, 2015). Para contrarrestar esta situación, se tiene como alternativa el uso de organismo biológicos como biomonitores de los contaminantes (Malizia *et al.*, 2012; Salo, 2014; Stankovic *et al.*, 2014).

Los musgos han demostrado ser buenos bioindicadores de la contaminación del aire (Qarri *et al.*, 2014; Salo, 2014; Zepeda *et al.*, 2014) y desde hace varios años se han empleado en estudios para evaluar la calidad del aire (De Nicola *et al.*, 2013; Salo y Mäkinen, 2014; Vuković *et al.*, 2015), ya sea mediante biomonitoreo pasivo o activo. En el primer caso el musgo se colecta directamente en el sitio de muestreo y se procede a analizarlo; en el



Memoria de resúmenes en Extenso

XV Congreso Internacional Academia Nacional de Ciencias Ambientales | XXI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales “La cultura de los pueblos, base para la conservación del ambiente”

segundo el musgo es retirado del hábitat natural para ser trasplantado a los sitios de monitoreo durante cierto tiempo, posteriormente es retirado y analizado (Ares *et al.*, 2012; Boquete *et al.*, 2013).

En la Zona Metropolitana del Valle de Toluca (ZMVT), se han llevado a cabo estudios sobre biomonitoreo atmosférico con musgos (Zarazúa *et al.*, 2013), complementados con estudios de la distribución y abundancia de las especies de musgos nativos (Zepeda *et al.*, 2014). Estos estudios han demostrado que las especies *Fabronia ciliaris* y *Leskea angustata* cumplen con las características deseables en los organismos bioacumuladores de metales y por lo tanto buenos bioindicadores de la contaminación del aire. Estas dos especies también resultaron ser de las más abundantes en la ZMVT. De acuerdo a lo anterior se eligieron estas dos especies para realizar el cultivo.

Si bien el biomonitoreo activo es un método relativamente económico y fácil de implementar, hay varios estudios que demuestran que al ser retirada gran cantidad de musgo de su hábitat natural, se altera el equilibrio ecológico de dicha zona (Tacoronte *et al.* 2009; Ares *et al.*, 2012; Barandovski *et al.*, 2015), Una alternativa que se presenta para esta situación es precisamente el cultivo de musgos *in vitro*.

El objetivo de este trabajo fue cultivar *in vitro* las especies de musgo *Fabronia ciliaris* y *Leskea angustata*, así como el musgo modelo *Physcomitrella patens*, observando de forma cualitativa su crecimiento. Tomando como base los requerimientos empleados para el cultivo de esta especie. La hipótesis de trabajo propone que el musgo obtenido del cultivo esté libre de contaminantes y al ser expuesto en el lugar contaminado, permita obtener los niveles de contaminación del lugar a monitorear y relacionar éstos valores con el tiempo de exposición.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fase de campo

La recolección del musgo de las especies *Fabronia ciliaris* y de *Leskea angustata* se llevó a cabo en el Municipio de Ocoyoacac, Estado de México, dentro del área perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, en el mes de septiembre de 2015. Se recolectó únicamente aquel musgo que contara con la presencia de esporofitos, las muestras se colocaron en recipientes de plástico para posteriormente ser identificadas y extraer los



Memoria de resúmenes en Extenso

XV Congreso Internacional Academia Nacional de Ciencias Ambientales | XXI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales “La cultura de los pueblos, base para la conservación del ambiente”

esporofitos. Las esporas de *Physcomitrella patens* se obtuvieron del laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación en Dinámica Celular de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Cultivo a partir de esporas

Con la ayuda de un microscopio estereoscópico y pinzas con punta, se extrajeron las cápsulas de esporas de cada una de las especies: *Fabronia ciliaris* y *Leskea angustata*; enseguida las cápsulas del esporofito fueron separadas de sus setas cuidadosamente para posteriormente esterilizarlos e iniciar el cultivo.

Las cápsulas de las tres especies de musgos se esterilizaron con el fin de eliminar agentes contaminantes. Las cápsulas se colocaron en una solución de NaClO al 1%; tres de ellas (una de cada especie) se dejaron en la solución durante 5 min. Enseguida fueron lavadas varias veces con agua destilada estéril para eliminar restos del NaClO.

Una vez que las cápsulas se esterilizaron, cada una se colocó en aproximadamente 100 μL de agua estéril, donde se rompieron utilizando una punta de micropipeta para liberar las esporas, posteriormente se agregaron 900 μL más de agua estéril. Finalmente esta solución se dispersó varias cajas Petri previamente preparadas con el medio de cultivo BCD (Cove *et al.*, 2009) y cubiertas con papel celofán.

Las cajas Petri se sellaron con Parafilm y cinta micropore y se colocaron dentro de una incubadora para cultivo de tejidos. Los cultivos se incubaron durante tres meses a 25 °C, con una iluminación en fotoperiodos de 16 h y 8 h oscuridad, con una intensidad de entre 5 y 20 W m^{-2} (Cove *et al.*, 2005).

Cultivo a partir de tejido

Después de los tres meses de incubación de los musgos en cajas Petri, el tejido de musgo se colocó en un tubo de plástico con 15 mL de agua estéril y se fragmentó utilizando un molino para tejidos; la mezcla fue vertida en frascos de vidrio de 145 cm^3 que contenían Turba Jiffy® hidratadas y esterilizadas. Posteriormente se colocó su tapa plástica y la unión del frasco tapa se selló con Parafilm, para ser incubados durante un mes bajo las mismas condiciones de temperatura, humedad y luz, mencionadas anteriormente. Observando únicamente su crecimiento sin medir variables o parámetros.



Memoria de resúmenes en Extenso

XV Congreso Internacional Academia Nacional de Ciencias Ambientales | XXI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales “La cultura de los pueblos, base para la conservación del ambiente”

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cultivo de *Physcomitrella patens* reportado por Cove et al., 2009, sirvió de base para el proceso realizado a las especies *Fabronia ciliaris* y *Leskea angustata*, ya que no se contaba con referencias al respecto de su cultivo *in vitro*.

El cloronema de los musgos presenta un crecimiento lento, sin embargo, el caulonema crece a una velocidad mayor que el cloronema (Cove et al., 2006). En *Physcomitrella patens* la velocidad de elongación de las células apicales del cloronema es de 2 a 5 $\mu\text{m h}^{-1}$, (Cove, 2005), mientras que las células apicales del caulonema se extienden a una velocidad de 25 a 40 $\mu\text{m h}^{-1}$. La tasa de crecimiento del cloronema y del caulonema para *Fabronia ciliaris* y *Leskea angustata* es mucho menor que el de *Physcomitrella patens*. Durante el cultivo, respecto a *Fabronia ciliaris*, se observa un crecimiento mucho más lento que el de *Physcomitrella patens*, lo cual se atribuye principalmente a características propias de la especie y quizás en parte a que el medio de cultivo empleado está optimizado para dicha especie y no para *Fabronia ciliaris*.

Cultivo a partir de esporas

La germinación de *Fabronia ciliaris* y *Physcomitrella patens* resultó exitosa, ya que la gran mayoría de las esporas germinaron y se desarrollaron en plantas independientes. Aunque las esporas de *Leskea angustata*, germinaron, éstas no continuaron su desarrollo y en algunos casos encontramos problemas de contaminación. Cabe resaltar que el cultivo de *L. angustata* se logró establecer en el laboratorio al germinar las esporas directamente sobre el sustrato de Jiffys®, aunque su crecimiento fue cualitativamente mucho más lento que el de *P.patens*.

Respecto a *Fabronia ciliaris*, se observa un crecimiento mucho más lento que el de *Physcomitrella patens*, lo cual se atribuye principalmente a características propias de la especie y quizás en parte a que el medio de cultivo empleado está optimizado para dicha especie y no para *Fabronia ciliaris*.

Cultivo a partir de tejido

Por otro lado, al realizar el cultivo en el sustrato de la Jiffy® a partir del tejido, se observó que *F. ciliaris* presentó un crecimiento más acelerado que sobre medio BCD, sin embargo este crecimiento continúa siendo mucho más lento que el observado para *Physcomitrella patens*.



Memoria de resúmenes en Extenso

XV Congreso Internacional Academia Nacional de Ciencias Ambientales | XXI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales “La cultura de los pueblos, base para la conservación del ambiente”

CONCLUSIONES

A partir de este método se aseguró la obtención de cultivos asépticos *in vitro* de musgo para su posterior exposición al ambiente, y ser utilizado como biomonitor de la contaminación atmosférica, permitiendo determinar la acumulación de contaminantes en un periodo determinado de exposición del musgo. Se sugiere continuar con el cultivo del musgo a partir de tejido, ya que su crecimiento es más rápido.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Cárdenas por permitirnos utilizar las instalaciones del laboratorio de Biotecnología de la UNAM, así como al Dr. Pedro Ávila Pérez por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

LITERATURA CITADA

- Ares, A., J. R. Aboal, A. Carballeira, S. Giordano, P. Adamo and J. A. Fernández. 2012. Moss bag biomonitoring: a methodological review. *The Science of the Total Environment* 432:143-58.
- Barandovski, L., M. Frontasyeva, T. Stafilov, R. Sajn and T. Ostrovnaya. 2015. Multi-element atmospheric deposition in Macedonia studied by the moss biomonitoring technique. *Environmental Science and Pollution Research* 22:16077-16097.
- Boquete, M., J. Fernández, A. Carballeira and J. Aboal. 2013. Assessing the tolerance of the terrestrial moss *Pseudoscleropodium purum* to high levels of atmospheric heavy metals: A reciprocal transplant study. *Science of the Total Environment* 461-462: 552-559.
- Cove D. 2005. The moss *Physcomitrella patens*. *Annual Reviews Genetic* 39: 339-358
- Cove D, M. Bezanilla, P. Harries and R. Quatrano. 2006. Mosses as Model Systems for the Study of Metabolism and Development. *The Annual Review of Plant Biology* 57:497-520



Memoria de resúmenes en Extenso

XV Congreso Internacional Academia Nacional de Ciencias Ambientales | XXI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales “La cultura de los pueblos, base para la conservación del ambiente”

- Cove, D. J., P. Pierre-Francois, C. Audra, S. F. McDaniel, A. Khandelwal and R. S. Quatrano. 2009. Culturing the moss *Physcomitrella patens*. Cold Spring Harbor Protocols 4: 1-6.
- De Nicola, F., F. Murena, M. Costagliola, A. Alfani, D. Baldantoni, M. Prati, L. Sessa, V. Spagnuolo and S. Giordano. 2013. A multi-approach monitoring of particulate matter, metals and PAHs in an urban street canyon. Environmental Science and Pollution Research 20:4969–4979.
- Malizia, D., A. Giuliano, G. Ortaggi and A. Masotti. 2012. Common plants as alternative analytical tools to monitor heavy metals in soil. Chemistry Central Journal 6: S6.
- Pan, Y., S. Tian, X. Li, Y. Sun, Y. Li, G. Wentworth and Y. Wang. 2015. Trace elements in particulate matter from metropolitan regions of Northern China: Sources, concentrations and size distributions. Science of the Total Environment 537: 9-22.
- Qarri, F., P. Lazo, L. Bektashi, T. Stafilov, M. Frontasyeva and H. Harmens. 2014. The effect of sampling scheme in the survey of atmospheric deposition of heavy metals in Albania by using moss biomonitoring. Environmental Science and Pollution Research 22:2258–2271.
- Salo, H. 2014. Preliminary comparison of the suitability of three sampling materials to air pollution monitoring. Fennia, 192: 154-163.
- Salo, H. and J. Mâkinen. 2014. Magnetic biomonitoring by moss bags for industry-derived air pollution in SW Finland. Atmospheric environment 97:19-27.
- Stankovic, S., P. Kalaba and A. Stankovic. 2014. Biota as toxic metal indicators. Environmental Chemistry Letters 12:63-84.
- Tacoronte, M., Y. León, A. Olivo and M. Vielma. 2009. Crecimiento in vitro de musgos del bosque nublado andino de Venezuela. Revista Forestal Latinoamericana 24:69–89.
- Vuković, G., M. Anicic, M. Tomasevic, R. Samson and A. Popovic. 2015. Biomagnetic monitoring of urban air pollution using moss bags (*Sphagnum girgensohnii*). Ecological Indicators 52:40-47.
- Yang, Y., L. Liu, L. Guo, Y. Lv, G. Zhang, J. Lei, W. Liu, Y. Xiong and H. Wen. 2015. Seasonal concentrations, contamination levels, and health risk assessment of arsenic and heavy metals



Memoria de resúmenes en Extenso

XV Congreso Internacional Academia Nacional de Ciencias Ambientales | XXI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales “La cultura de los pueblos, base para la conservación del ambiente”

in the suspended particulate matter from an urban household environment in a metropolitan city, Beijing, China. *Environmental Monitoring and Assessment* 187: 409-423.

Zarazúa-Ortega, G., J. Poblano-Bata, S. Tejeda-Vega, P. Ávila-Pérez, C. Zepeda-Gómez, H. Ortiz-Oliveros and G. Macedo-Miranda. 2013. Assessment of Spatial Variability of Heavy Metals in Metropolitan Zone of Toluca Valley, Mexico, Using the Biomonitoring Technique in Mosses and TXRF Analysis. *The Scientific World Journal*, 2013: 426-492.

Zepeda-Gómez, C., P. Ávila-Pérez, U. Díaz-García, Y. Alanís-Martínez, G. Zarazúa-Ortega and A. Amaya-Chávez. 2014. Diversidad de musgos epifitos de la zona metropolitana del valle de Toluca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 108-124.

Zhang, J., L. Sun, O. Barrett, S. Bertazzon, F. Underwood and M. Johnson. 2015. Development of land-use regression models for metals associated with airborne particulate matter in a North American city. *Atmospheric Environment* 106: 165-177.