

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

ACUMULACIÓN DE CROMO EN
Ricinus communis L. y *Reseda luteola* L.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A

ADRIANA MARTÍNEZ JURADO

TUTORA:

DRA. MARÍA ISABEL SAAD VILLEGAS



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

México, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



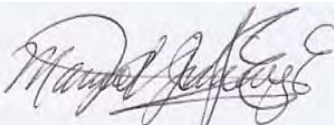


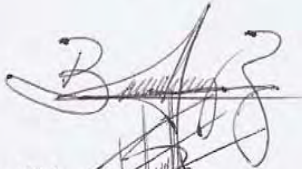

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO

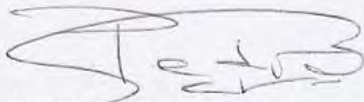
Propietario	Dr. Manuel Jiménez Estrada	
Propietario	M. en B. María Eugenia Muñiz Díaz de León	
Propietario Tutor	Dra. María Isabel Saad Villegas	
Suplente	M. en C. Beatriz Zuñiga Ruiz	
Suplente	M. en Q. Luis Felipe Juárez Santillán.	

Atentamente,

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU ”

Ciudad Universitaria, D. F., a 27 de marzo de 2009

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA



DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

*Xopanmilli
Mahtlaniliztli Mahcuepiliztli
Toquiztli
Chicomexochitl
Pixquiztli
Nochi inin tiquelcahqueh
tehuantin timacehualtzintzin in tlein
tihuahahcico nican hueyi altepetl
Pehua yolnemiliztli, cuahnemiztli*

*La milpa del temporal
El trabajo colectivo durante la siembra
El siete flor
El tiempo de la cosecha
Todo esto olvidamos
nosotros los macehuales,
los que hemos venido
a esta gran ciudad
Empieza el tiempo de la reflexión*

*Fragmentos tomados de Tehuantin
ayoc cintli totec-Nosotros ya no somos
de maíz, Santos de la Cruz Hernández.*

AGRADECIMIENTOS

A los titulares del Taller de Fitorremediación: Dr. Manuel Jiménez Estrada y Dr. María Isabel Saad Villegas por el apoyo y los conocimientos obtenidos a lo largo de mi estancia en el laboratorio. A mis compañeros y amigos que forman parte del Taller: Alejandra Venegas, Ana Belen Adame, Diana Young, Felipe Eslava, Mónica Godart y Rosa Solano por su compañerismo y apoyo como grupo de trabajo. A la M. en B. María Eugenia Muñiz Díaz de León y a la M. en C. Beatriz Zúñiga Ruiz por la facilidad del uso de equipo de laboratorio. A Patricia Olguín por su respaldo en el uso de las instalaciones del invernadero. Y al M. en Q. Felipe Juárez Santillán por su apoyo en la determinación de Cr y el uso de equipo de laboratorio.

A mi familia por ser la base de mi formación como ser humano y de mi educación, por ser el sostén económico y moral para poder concluir mi carrera profesional. A los amigos que he conocido durante toda mi vida y que me han acompañado a lo largo del camino. A los profesores que con sus conocimientos me mostraron que no tan sólo es importante la información sino también la formación. Y a la UNAM, institución que me ha cultivado de una forma humana y científica.

Este trabajo se realizó dentro de las actividades del Taller de Fitorremediación de sustancias tóxicas y compuestos orgánicos de suelos y cuerpos de agua, en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. La investigación contó con el apoyo de DGAPA, UNAM. No. de proyecto PAPIME PE206605.

Hoja de datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Martínez Jurado Adriana 54 89 80 39 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 300220528</p>
<p>2. Datos del tutor Dra. María Isabel Saad Villegas</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dr. Manuel Jiménez Estrada</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 M. en B. María Eugenia Muñiz Díaz de León</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 M. en C. Beatriz Zúñiga Ruiz</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 M. en Q. Luis Felipe Juárez Santillán</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Acumulación de cromo en <i>Ricinus communis</i> L. y <i>Reseda luteola</i> L. 64 p 2009</p>

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN.....	8
2 ANTECEDENTES	10
2.1 Contaminación ambiental	10
2.1.1 Contaminación de suelos.....	12
2.1.2 Contaminación por metales pesados	13
2.1.3 Contaminación en México por metales pesados.....	16
2.2 Cromo en el ambiente.....	18
2.2.1 Cromo en suelo y agua.....	20
2.2.2 Toxicidad de cromo en plantas.....	21
2.2.3 Daños en la salud a causa del cromo	22
2.3 Biorremediación.....	23
2.4 Fitorremediación.....	24
2.5 Micorrizas.....	25
2.5.1 Micorrizas en la respuesta a metales pesados.....	27
2.6 <i>Ricinus communis</i> L.	28
2.7 <i>Reseda luteola</i> L.	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo general.....	31
3.2 Objetivos particulares.....	31
4 METODOLOGÍA.....	32
4.1 Estrategia desarrollada.....	32
4.2 Estudio de herbario.....	34
4.3 Selección de sitios de colecta.....	34
4.4 Colecta de material biológico	34
4.4.1 Semillas.....	34
4.4.2 Esporas y raíces micorrizadas	35
4.5 Establecimiento de condiciones de germinación.....	35
4.5.1 <i>Ricinus communis</i>	35
4.5.2 <i>Reseda luteola</i>	35
4.6 Experimentos de germinación con Cr	36
4.6.1 <i>Ricinus communis</i>	36
4.6.2 <i>Reseda luteola</i>	36
4.7 Experimentos de bioacumulación	37

4.8	Cuantificación de cromo acumulado en los tejidos de las plantas	38
4.8.1	Digestión	38
4.8.2	Determinación de pH y potencial redox (Eh).....	38
4.8.3	Determinación de cromo acumulado.....	39
4.9	Asociación micorrízica.....	39
4.9.1	Obtención de esporas	39
4.9.2	Raíces micorrizadas.....	40
4.9.3	Evaluación de estructuras micorrízicas por microscopía.....	40
4.9.4	Análisis estadístico.....	40
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
5.1	Estudio de herbario.....	41
5.2	Condiciones óptimas de germinación de <i>Reseda luteola</i> y <i>Ricinus communis</i>	43
5.3	Tolerancia a Cr durante la germinación.....	44
5.4	Acumulación de cromo en diferentes órganos de las plantas	47
5.5	Asociación micorrízica.....	53
6	CONCLUSIONES.....	55
7	ANEXOS	57
8	BIBLIOGRAFÍA.....	60

1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad se ha demostrado que la contaminación con metales y xenobióticos es un problema ambiental global (Krämer, 2005). Dentro de los diferentes elementos clasificados como metales pesados, el Cr es considerado un serio contaminante ambiental, debido a su amplio uso industrial (principalmente en curtido de pieles y la galvanoplastia) y a los efectos que provoca en la biodiversidad, en la salud humana y animal (Shanker *et al.*, 2005). El impacto de la contaminación de Cr en el ambiente llega hasta el ser humano por medio de las cadenas tróficas, provoca alteraciones importantes en diferentes órganos, es cancerígeno y un agente mutagénico. Por lo cual es importante estudiar estrategias que permitan su remoción del ambiente.

En estos últimos años se han utilizado estrategias de biorremediación para tratar de solucionar los problemas de contaminación en suelos y cuerpos de agua. Una de las técnicas de biorremediación con mayor auge en la actualidad es la fitorremediación, que se basa en el uso de plantas, que tienen la capacidad de acumular elementos tóxicos y contaminantes orgánicos. Dentro de la fitorremediación se encuentra la fitoextracción que implica el cultivo de las plantas tolerantes a contaminantes del suelo para que los concentren en sus tejidos aéreos. Al final del período de crecimiento, la biomasa de la planta se cosecha, se seca o se incinera, y el material contaminante se deposita en un contenedor especial o se agrega en un fundidor (Raskin y Ensley, 2000).

Cuando se considera la biorremediación de suelos contaminados con metales tóxicos, el uso de plantas es una opción viable porque ofrecen una amplia gama de posibilidades bioquímicas. Antes de iniciar los procesos de recuperación de suelos contaminados, es importante localizar en la biodiversidad plantas que reúnan ciertos requisitos, como son: que acumulen grandes concentraciones del metal en sus tejidos (esto es que sean hiperacumuladoras), sin que presenten algún síntoma de toxicidad; que tengan biomasa abundante, un sistema extenso de raíces, rápido crecimiento y capacidad de crecer en una amplia gama de condiciones geográficas (Garbisu y Alkorta, 2001).

En el presente estudio se probó la capacidad de acumulación de Cr VI en dos especies vegetales: *Ricinus communis* L. y *Reseda luteola* L., que son plantas que reúnen las características mencionadas anteriormente y son capaces de crecer en suelos fuertemente contaminados con metales pesados, con el propósito de proponer a estas especies vegetales como candidatas para su uso en procesos de fitorremediación.

2 ANTECEDENTES

2.1 Contaminación ambiental

A través de la historia, el ser humano se ha respaldado en la naturaleza para solventar sus necesidades, modificando extensamente los ecosistemas, tal es el caso de las diversas transformaciones en el ambiente causadas por la Revolución Industrial, proceso histórico que permitió un aumento del consumo energético debido a los requerimientos demandados por las industrias, de esta manera, en un principio se obtuvo la energía a través de la combustión de madera y carbón; con el inicio del siglo XX tuvo lugar el reemplazo gradual de los combustibles fósiles (carbón, lignito, turba) por combustibles líquidos (petróleo) y más tarde, por combustibles gaseosos (gas natural) (Antón, 2000); provocando transformaciones en el ambiente, estas alteraciones aunado al aumento poblacional han causado de manera extensiva un alto consumo de energía, transporte y actividades industriales; dando lugar a problemas de contaminación en suelos, agua y aire que han impactado de manera significativa en la salud humana, en la productividad agrícola y en los ecosistemas. Este es un tema de importancia actual a nivel mundial, resulta prioritario desarrollar nuevas tecnologías que permitan un manejo sustentable de los recursos naturales y la recuperación de los ecosistemas alterados.

La contaminación de los ecosistemas ocurre cuando un elemento o una sustancia esta presente en grandes concentraciones como resultado de la actividad humana y

tiene un efecto final perjudicial en el ambiente y sus componentes (Kabata y Pendias, 2001). Los contaminantes se originan de diversas fuentes y se transportan por el aire, suelo, agua y biota, el movimiento y destino de los contaminantes ambientales depende de sus propiedades y de las condiciones del medio ambiente, estos aspectos son clave en la determinación de sus impactos (Manahan, 2007).

La contaminación ambiental puede dividirse en tres tipos: biológica, física y química. La contaminación biológica ocurre cuando están presentes microorganismos en un sustrato determinado, en concentraciones por arriba de lo normal, es decir, excede las concentraciones naturales del ambiente. Como ejemplo se hace mención a los organismos que causan enfermedades humanas. La contaminación física incluye formas de energía, tales como el calor, ruido, radioactividad, así como partículas de humo y polvo. Los contaminantes químicos son intrínsecamente dañinos; incluyen metales pesados y un amplio rango de químicos orgánicos fabricados por el hombre, como los pesticidas (Rana, 2006). Los contaminantes se almacenan en el suelo, agua y aire en donde se acumulan y son transportados hasta llegar a los organismos vivos provocando daño en su desarrollo y fisiología. Y por lo tanto, dan lugar a alteraciones en las redes tróficas.

La contaminación ambiental tiene efectos en el aire, agua y suelo. El ser humano ha hecho un uso aún más intensivo de combustibles, como el gas y los derivados del petróleo, cuyos productos de combustión son los principales causantes de la contaminación atmosférica (Solís y López, 2003). Los contaminantes atmosféricos

son materiales químicos que en forma de gases, vapores, polvos y aerosoles se encuentran en la región de la atmósfera más cercana a la tierra.

El origen de la contaminación del agua es muy variado, pero principalmente se mencionan a los desechos urbanos e industriales, los drenados y lixiviados de la agricultura y de las minas, la erosión, los derrames de sustancias tóxicas, los efluentes de plantas depuradoras, los subproductos de los procesos de depuración, la ruptura de drenajes, entre otros. En el agua, los contaminantes tienen un tiempo de residencia medio; el daño que causan a los organismos es considerado alto, debido a que los contaminantes se ingieren por esta vía y su uniformidad de dispersión es media (Bautista, 1999).

2.1.1 Contaminación de suelos

El suelo es un ecosistema compuesto por una mezcla compleja de materiales inorgánicos (fracción mineral, formada principalmente de arcillas, limo y arena), materia orgánica, líquidos, gases y una comunidad biológica compleja. El suelo constituye un recurso natural de gran importancia, que desempeña funciones en la superficie terrestre como reactor nuclear, siendo un elemento filtrante, amortiguador y transformador que regula los ciclos biogeoquímicos (Volke, 2005).

Los suelos constituyen un sistema vital de alta importancia, la mayor parte de la producción alimentaria depende de ellos. La erosión de los suelos es un proceso

natural y permanente, pero lento, en los ecosistemas no perturbados, que están protegidos por una cubierta vegetal (Solís y López, 2003). La erosión se acelera cuando la vegetación natural se retira. La contaminación de los suelos afecta especialmente a las zonas rurales agrícolas. Los fertilizantes químicos aumentan ciertamente los rendimientos de las tierras de cultivo, pero su constante e inadecuado uso conduce a la contaminación del suelo debido a las impurezas que contienen y a la presencia excesiva de algunas sales nutritivas. Los fosfatos y nitratos colocados en exceso son arrastrados por el agua superficial y contaminan los mantos freáticos. Los pesticidas minerales u orgánicos utilizados para proteger los cultivos pueden ser la causa de la contaminación de suelos y de la biomasa. También, el suelo recibe a través de las lluvias metales tóxicos e incluso partículas radionucleoides (Ernst, 1996).

En el suelo, el tiempo de residencia de los contaminantes suele ser alto (especialmente de los que se consideran contaminantes recalcitrantes) y generalmente los contaminantes tanto del aire como del agua llegan a él. El daño a los organismos con frecuencia es considerable; suele alcanzar niveles medios para los animales y altos para las plantas. En general, la uniformidad de la dispersión de los contaminantes en los suelos es baja o muy baja, ya que a menudo la contaminación es puntual (Bautista, 1999).

2.1.2 Contaminación por metales pesados

Dentro de los contaminantes que son de importancia económica, se encuentran los contaminantes inorgánicos, principalmente los metales pesados. Estos elementos se encuentran en la corteza terrestre y son utilizados en muchos procesos industriales para elaborar todo tipo de productos (Garbisu y Alkorta, 2001). La incorporación de metales pesados dentro de complejos inorgánicos y organometálicos presentes en los organismos a menudo alteran su actividad biológica, probablemente incrementan la toxicidad, debido al aumento en la biodisponibilidad. Además, las condiciones de pH, potencial redox, el incremento de la temperatura y los ciclos naturales pueden intervenir para convertir o movilizar, en alguna medida, especies inorgánicas benignas para complejos orgánicos tóxicos (Bonaventura y Johnson, 1997; Gupta, 1992).

En general, se define a los metales pesados como aquellos elementos cuya densidad es mayor a 5g/ml (Kabata y Pendias, 2001). Para la mayoría de los organismos es extremadamente toxica la exposición a un exceso de metales pesados como Cd, Hg, Cr, Ni y Pb. Los iones metálicos tóxicos suelen penetrar a la célula a través de los mismos sistemas de captación que utilizan los iones metálicos fisiológicamente importantes como Ca, Mg, Cu y Zn (Kabata y Pendias, 2001; Cobbett, 2003).

Los metales pesados en los suelos interactúan con las arcillas, la materia orgánica (polisacáridos, carbohidratos, aminoácidos, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, entre otros), carbonatos, sulfatos. Además, interactúan con otras moléculas favoreciendo procesos de adsorción, sustitución isomórfica, quelación, precipitación, oxidación y reducción. Dependiendo de las propiedades particulares del suelo, estas interacciones pueden ser benéficas, dañinas o no presentar efectos importantes para el ecosistema (Bautista, 1999; Ernst, 1996).

Las industrias que presentan mayores emisiones de metales pesados, según el elemento (Cervantes y Moreno, 1999) son:

a) Cadmio (Cd)

Procesadoras de baterías y acumuladores, cables eléctricos, celdas fotoeléctricas, cloruro de polivinilo, colorantes, equipos para ruedas, fusibles, joyería, laminados a vapor y soldadura. Otras fuentes atmosféricas de contaminación por Cd son el procesamiento de metales (aleaciones con Cd), la combustión de diesel y petróleo, los fertilizantes fosfatados y los pesticidas.

b) Cromo (Cr)

Industrias procesadoras de cemento, colorantes, curtiduría, material fotográfico, materiales refractarios, metalurgia y pinturas.

c) Níquel (Ni)

Termoeléctricas, utensilios domésticos, pinturas, cerámica, aceros, metalurgia, joyería, prótesis dentales y quirúrgicas.

d) Plomo (Pb)

Combustión de gasolina con Pb, plantas de fundición de metales, pesticidas con arsenato de plomo, fertilizantes fosfatados y pinturas con Pb; también el empleo de barro vidriado para cocinar o guardar alimentos.

e) Arsénico (As)

Fertilizantes, pesticidas y la combustión de energéticos fósiles;.

f) Mercurio (Hg)

Minería (extracción de oro), fabricación electrolítica de Hg, fabricación de equipo eléctrico, industria del papel y celulosa, fungicidas mercuriales.

2.1.3 Contaminación en México por metales pesados

En México desde tiempo atrás existen problemas importantes de contaminación ambiental por plomo. La cantidad de este metal liberada al ambiente se encuentra estrechamente relacionada con la producción industrial de este elemento. Aproximadamente la mitad del plomo que se produce se libera como contaminante. Los yacimientos de minerales de plomo que se explotan en México abarcan más de 20 estados, los principales productores son: Coahuila, Chihuahua y Nuevo León. Dos terceras partes del plomo que es extraído en nuestro país, es destinado a la fabricación de óxidos, materia prima para las industrias de hierro, acero, textil, metalurgia de celulosa y papel (Coll *et al.*, 2001).

Algunas otras fuentes que generan la contaminación por metales en el país son: descargas y drenajes industriales. Ciertas industrias pueden generar residuos con

concentraciones importantes de metales por las características de sus procesos. El drenaje doméstico transporta metales, la quema de combustibles fósiles es la principal fuente de metales hacia la atmósfera y fuente potencial de contaminación de cuerpos superficiales de agua (Volke *et al.*, 2005).

La minería ha constituido un factor de gran importancia en el devenir de la historia económica de México, esta actividad ha desempeñado un papel fundamental en el surgimiento y organización de los espacios económicos. Desde el punto de vista minero, la región más importante del país es la del norte: Sonora, Chihuahua, Coahuila, Zacatecas, Durango y San Luis Potosí, en donde se concentra la extracción de oro, plata, carbón, zinc, plomo y cobre, así como de minerales no metálicos de importancia como la barita y la celestita. Por otra parte, las actividades extractivas hacen uso del suelo y del subsuelo en forma temporal pero intensa, provocando importantes alteraciones al medio ambiente tanto bajo la forma de modificación del relieve, en el caso de las obras en los tajos a cielo abierto, como de contaminación directa de agua, suelo y aire, en el caso de las plantas de beneficio y fundiciones, Una vez terminados los trabajos, las áreas mineras quedan abandonadas y muy rara vez se realizan trabajos de rehabilitación de los terrenos minados o de limpieza de tierras contaminadas (Coll *et al.*, 2001).

La excavación de minas, la remoción de minerales y el proceso y extracción de metales puede causar daños ambientales y, en casos extremos, destruir el ecosistema. Por ejemplo, se pueden dañar tierras de cultivo, favorecer la erosión y

contaminar cuerpos de agua con sales solubles de elementos potencialmente tóxicos como As, Se, Pb, Cd y óxidos de S, entre otros. Como en ningún proceso de concentración se logra una recuperación del 100 % del mineral, los desechos mineros (jales) siempre contienen residuos del mineral. Era común que muchas empresas descartaran sus desechos en ríos o los dispusieran en grandes pilas. La composición de estos residuos puede ser muy diversa en su naturaleza química y mineralógica. El impacto de la minería sobre el ambiente y la salud se relaciona con la composición del mineral, el tipo de explotación, el proceso de beneficio, la escala de las operaciones y las características del entorno (Volke *et al.*, 2005).

2.2 Cromo en el ambiente

El Cr está ampliamente distribuido en la naturaleza, ocupando la posición 21 en el índice de compuestos más comunes en la corteza terrestre. El cromo se produce en la naturaleza en forma de un compuesto (cromo+oxígeno+hierro) conocido como cromita. La distribución geográfica de las minas de cromita es irregular. Arriba de los 95% de minerales de cromita económicamente viables están situadas en la parte sur de África (Chandra y Kulshreshtha, 2004).

El Cr es un metal de transición localizado en el grupo VI-B de la tabla periódica. Aunque es capaz de existir en varios estados de oxidación, las formas más estables y comunes son la especie trivalente Cr III y la hexavalente Cr VI, las cuales manifiestan diferentes propiedades químicas. El Cr VI, considerada la forma más

tóxica del Cr, está usualmente asociada con el oxígeno como iones de cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). En contraste, el Cr III en la forma de óxidos, hidróxidos o sulfatos, es menos móvil y existe principalmente unido a materia orgánica en el suelo y ambientes acuáticos. El Cr VI es un agente fuertemente oxidante y con la presencia de materia orgánica es reducido a Cr III; esta transformación es rápida en ambientes ácidos. Sin embargo, altos niveles de Cr VI pueden superar la capacidad de reducción del ambiente y así esta forma tóxica de Cr persiste como un contaminante en el ambiente. En adición, el Cr III puede ser también oxidado a Cr VI en la presencia de un exceso de oxígeno el cromo se transforma nuevamente en la forma más tóxica. (Cervantes *et al.*, 2001)

El Cr tiene múltiples usos industriales. Se utiliza ampliamente en el procesamiento y acabado de pieles, en la producción de acero resistente, agentes limpiadores de galvanoplastia, manufactura de catalizadores y en la producción de ácido crómico y químicos especiales. Los compuestos de Cr VI son usados en la industria para el blindaje o chapado de metales, y en la preservación de madera. La industria de pieles es la mayor causa para la alta afluencia de Cr en la atmósfera, produciendo el 40% del total del uso industrial (Shanker *et al.*, 2005).

La composición del suelo (disponibilidad de donación de electrones, textura, competencia de iones, capacidad de absorción, entre otros) y las condiciones en el suelo (pH, contenido de humedad, temperatura, Eh y la presencia de vegetación) son los factores principales que afectan la movilidad del Cr. El cromato (CrO_4^{2-}),

cromato ácido (HCrO_4^-) y dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) son débilmente absorbidos bajo condiciones de alcalinas a ligeramente ácidas, principalmente conduciendo a una alta movilidad en la subsuperficie. La presencia de otros aniones en el suelo reduce los sitios del potencial de absorción, resultando un incremento en la movilidad del (CrO_4^{2-}). La movilidad del (CrO_4^{2-}) en agua subterránea aumenta a pH neutral, especialmente con la presencia de oxianiones (Banks *et al.*, 2006).

Los suelos pueden contener entre 5 a 300 μg de Cr por gramo. La producción de Cr en el mundo esta en el orden de 10^7 toneladas por año; del 60-70% es usado principalmente en el curtido de pieles, pigmentos y galvanoplastia. Su uso es ampliamente difundido convirtiendo al Cr en un serio contaminante del aire, suelo y agua. Las concentraciones de Cr en agua no contaminada varia de 0.1 a 0.5 ppm en agua dulce y de 0.0016 a 0.05 ppm en aguas oceánicas, pero niveles altos como 80 ppm han sido observados en efluentes de fábricas de papel (Cervantes *et al.*, 2001).

2.2.1 Cromo en suelo y agua

El estado de oxidación del Cr en suelos contaminados es un importante indicador de toxicidad y movilidad potencial. El Cr VI es altamente tóxico y soluble, mientras que el Cr III es menos tóxico y relativamente insoluble.

Las concentraciones totales en el agua para beber son habitualmente inferiores a $2\mu\text{g/L}$. En general, los alimentos parecen ser la principal fuente de ingesta de este

elemento. Las principales fuentes de Cr en el agua son la industria de (CrO_4^{2-}), el empleo de conexiones cromadas en circuitos de enfriamiento de agua y acondicionamiento de aire, el agua de torres de enfriamiento a las que se añade Cr para evitar la corrosión y los catalizadores de síntesis orgánica y en fotografía. La toxicidad del Cr esta en función de su estado de oxidación; el Cr III no es tóxico, el Cr VI sí lo es. El Cr III rara vez se encuentra en el agua potable; desafortunadamente en el agua clorada o aereada es el Cr VI la forma predominante. La absorción de Cr vía oral es relativamente baja y depende del estado de oxidación. El Cr VI se absorbe más fácilmente a través del tracto gastrointestinal que el Cr III y puede atravesar las membranas celulares. De acuerdo con la OMS (1995) el valor guía para el cromo es $50\mu\text{g/L}$ (Jiménez, 2001).

2.2.2 Toxicidad de cromo en plantas

Los efectos tóxicos del Cr en el desarrollo de las plantas incluyen alteraciones en los procesos de germinación, así como en el crecimiento de raíz, tallo y hojas. El Cr también causa efectos deletéreos en los procesos fisiológicos de las plantas como la fotosíntesis, relaciones hídricas y nutrición mineral. El Cr es tóxico para muchas plantas a 100mg Kg^{-1} en peso seco (Shanker *et al.*, 2005).

La toxicidad del Cr esta relacionada con los procesos de reducción de Cr VI a estados de oxidación bajos, no necesariamente a Cr III, en el cual los radicales libres son generados. La reducción de Cr VI a Cr III ha sido reportada en muchos

sistemas biológicos. Los complejos del Cr(V) se forman fisiológicamente de Cr(VI) por agentes reductores tales como NAD(P)H, FADH₂, varias pentosas y glutatión. Estos complejos reaccionan con H₂O₂ para generar cantidades significativas de radicales OH, no asociados a la generación de O₂. Los radicales OH pueden provocar directamente alteraciones en el DNA, así como otros efectos tóxicos. Adicionalmente agentes reductores de cromato intracelular son las vitaminas C y B₁₂, citocromo P-450 y la cadena respiratoria mitocondrial. El Cr III intracelular puede ser secuestrado por grupos fosfato del DNA afectando la replicación, transcripción y causando mutagénesis. El daño oxidativo en el DNA es considerado la base de los efectos genotóxicos producidos por el Cr. El Cr III puede también reaccionar con grupos de enzimas carboxilo y sulfidriilo causando alteraciones en su estructura y actividades. La modificación de la DNA polimerasa y otras actividades enzimáticas pueden ser la causa del desplazamiento de iones de magnesio por el Cr III (Cervantes *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que el Cr VI produce serios daños a las células vivas, se considera que el Cr III es menos tóxico debido a su baja solubilidad, el cual impide la lixiviación dentro de la superficie del agua y su respuesta por las plantas. Sin embargo, estudios en plantas han mostrado que el Cr III también produce serios problemas en los tejidos vivos aunque a mayores concentraciones que el Cr VI. Estados progresivos de clorosis y necrosis son síntomas de toxicidad de cromo en plantas (Cervantes *et al.*, 2001).

2.2.3 Daños en la salud a causa del cromo

El envenenamiento por Cr producido en el curtido de pieles se conoce ampliamente. En los trabajadores se ha encontrado que padecen de úlceras, dermatitis, cáncer de pulmón y necrosis del hígado debido al contacto frecuente con las sales de Cr. Una de las más fuertes incidencias catastróficas de cáncer de pulmón, es el resultado de la inhalación de polvo que contiene Cr VI, esto fue reportado en 1960 en Japón. La contaminación de fuentes de agua, en la superficie y en su profundidad, por descargas indiscriminadas de desechos de Cr por las industrias ha llegado a afectar de manera global, por esto se ha creado una escasez aguda de agua segura para beber (Chandra y Kulshreshtha, 2004).

La alta solubilidad del Cr afecta a la salud pública desde las formas aniónicas, (CrO_4^{2-}) y ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), estos son considerados peligrosos y dañinos. La máxima concentración de Cr permitida en agua para beber es de 0.10 mg/l debido a los efectos tóxicos del Cr VI y del potencial de oxidación del Cr III y Cr VI (Banks *et al.*, 2006).

2.3 Biorremediación

Se le llama biorremediación al uso de organismos vivos para la remoción de contaminantes en el suelo y agua. Esta tecnología comenzó a tener gran importancia desde hace treinta años, cuando se observó que a través de la adición

de nutrientes al suelo se aumenta la población bacteriana que comienza a degradar compuestos, permitiendo la remoción de contaminantes (Litchfield, 2005). Sin embargo, el ser humano desde hace mucho tiempo ha realizado prácticas como el composteo para incorporar a los ciclos biogeoquímicos sus desechos domésticos.

Los procesos de biorremediación *in situ* pueden involucrar la adición de varios nutrientes, dependiendo de la química del suelo y agua, pero incluye a menudo la adición de un aceptor de electrones (oxígeno en algunas formas o nitrato), fosfatos y quizás nitrógeno como recurso. Los procesos pueden ser aplicados a la subsuperficie del suelo o acuíferos, así como a lagos y otros cuerpos de agua (Litchfield, 2005; Ernst, 1996).

Existen tres tipos de biorremediación: la biorremediación natural, la biorremediación *ex situ* y la fitorremediación. La biorremediación natural es la que no adiciona algún nutriente a la superficie del suelo, pero se realiza un monitoreo que permite identificar que la remoción de los contaminantes se lleva a cabo por la acción microbiana y no por el transporte de éstos. Otro tipo de biorremediación es la remediación *ex situ*, en la cual se utilizan los biorreactores, donde el suelo es tratado directamente en contenedores y ambientes controlados. Un tercer tipo de biorremediación es la fitorremediación, la cual consiste en el uso de plantas que tienen la capacidad de tolerar y acumular concentraciones inusuales de contaminantes en sus tejidos y que pueden ser cosechadas fácilmente. Este último tipo de biorremediación ha adquirido mucha atención debido a que las plantas llegan

a ser organismos con una gran facilidad de manejo en comparación con las bacterias, lo que trae consigo que esta tecnología tenga un costo más bajo que los métodos tradicionales de remoción de contaminantes (Garbisu y Alkorta, 2001; Lombi *et al.*, 2001).

2.4 Fitorremediación

La fitorremediación es el uso de plantas para remover contaminantes del suelo, agua y aire. Las plantas generalmente acumulan elementos esenciales y no esenciales en sus tejidos, pero existen plantas que pueden concentrar grandes cantidades de metales pesados y translocarlos a sus tejidos, además de no presentar algún daño por la toxicidad del contaminante.

La fitorremediación involucra tres procesos: la fitovolatilización, la fitoestabilización y la fitoextracción. En la fitovolatilización las plantas extraen metales volátiles (como el mercurio) de el suelo y los volatiliza de su follaje (Eapen y D'Souza, 2005). La fitoestabilización es usada porque provee una cubierta de vegetación para un sitio de moderado a altamente contaminado, previniendo así la erosión por viento y agua. Las plantas adecuadas para la fitoestabilización desarrollan un sistema extenso de raíces, proveen una buena cubierta al suelo, poseen tolerancia a metales tóxicos e idealmente inmovilizan los contaminantes en la rizósfera. Otra de las estrategias de la biorremediación es la fitoextracción. Ésta involucra el cultivo de plantas hiperacumuladoras que concentran contaminantes del suelo en sus tejidos aéreos.

Al final del periodo de crecimiento, la biomasa de la planta se cosecha, se seca o se incinera y el material enriquecido con el contaminante es depositado en un contenedor especial o dentro de un fundidor (Krämer, 2005).

La fitoextracción es exitosa, como una tecnología para limpiar el ambiente, dependiendo de varios factores como son el grado de contaminación del suelo, la disponibilidad del metal para la respuesta dentro de las raíces (biodisponibilidad) y la habilidad de la planta para absorber y acumular metales en plantas jóvenes (Ernst, 1996).

La planta adecuada para la fitorremediación debe poseer las siguientes características: 1) habilidad para acumular metales, 2) tolerancia a la concentración de metal acumulado, 3) rápido crecimiento y gran biomasa, 4) un sistema de raíces ampliamente ramificado y 5) que se pueda cosechar fácilmente (Eapen y D'Souza, 2005; Garbisu y Alkorta, 2001).

2.5 Micorrizas

Las micorrizas son una asociación mutualista en la que el hongo y la planta mantienen un balance de beneficios y costos positivos. Mediante esta asociación, el hongo incrementa la superficie de captación de nutrientes para la planta, principalmente de iones fosfato y amonio disponibles en el suelo, a cambio, el hongo además de contar con un hábitat, recibe azúcares simples derivados de la

fotosíntesis efectuada por el hospedero. Las asociaciones con micorrizas son cosmopolitas por su presencia en la mayoría de los hábitats naturales terrestres y generalistas por el amplio número de familias de plantas susceptibles de ser micorrizadas.

De acuerdo con el grado de penetración del hongo en la raíz del hospedero, las micorrizas se dividen en tres grupos: ectomicorriza, ectendomicorriza y endomicorriza. La ectomicorriza presenta un manto fúngico denso que cubre exteriormente la raíz de la planta, las hifas sólo penetran intercelularmente y forman una red en donde éstas presentan varias formas, dando lugar a la red de Hartig. La ectendomicorriza presenta un manto fúngico laxo, red de Hartig, a diferencia de la ectomicorriza, ésta presenta una penetración intracelular escasa. Dentro de las endocmicorrizas se encuentran las micorrizas arbusculares en donde el hongo penetra intracelular e intercelularmente y forma estructuras llamadas arbusculos y vesículas. Los arbusculos son ramificaciones de la hifa dentro de las células vegetales que permiten que se establezca un contacto íntimo entre los dos mutualistas y las vesículas son engrosamientos de hifas donde se almacenan lípidos y se presentan en los géneros *Glomus*, *Sclerosystis*, *Acaulospora* y *Entrophospora* (Smith *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 2003).

Los hongos micorrizógenos arbusculares son habitantes comunes del suelo y sus efectos sobre las plantas son diversos, como: una captación de nutrimentos más

eficiente, resistencia a patógenos y a condiciones ambientales adversas como sequías y niveles extremos de sales, pH y contaminantes (Hernández *et al.*, 2003).

2.5.1 Micorrizas en la respuesta a metales pesados

La disponibilidad de metales pesados para las plantas, depende de las reacciones de intercambio que se realizan entre el suelo, las raíces de las plantas, los complejos rizosféricos, así como de las actividades microbianas. De esta manera, los hongos micorrizógenos parecen jugar un papel central en la protección de las raíces al estrés ocasionado por metales pesados (Shützendübel y Polle, 2002; Pawlowska y Charvat, 2004; Ernst, 1996).

El papel específico de protección que desempeñan las micorrizas arbusculares depende de una variedad de factores, que incluye: las especies de plantas y hongos, el metal y su disponibilidad, las condiciones del suelo y las circunstancias particulares en las cuales se desarrolla la planta (Pawlowska y Charvat, 2004).

Las micorrizas han sido también reportadas en plantas que crecen en sitios contaminados con metales pesados, lo que indica que estos hongos están involucrados en la tolerancia a estos contaminantes y juegan un papel importante en la fitorremediación del sitio. También muchos autores han reportado esporas de hongos micorrizogenos arbusculares de los géneros *Glomus* y *Gigaspora* en plantas

que crecen en sitios con altas concentraciones de metales pesados (Khan *et al.*, 2000).

2.6 *Ricinus communis* L.

Ricinus communis L. pertenece a la familia Euphorbiaceae, es una planta herbácea, a veces arbustiva, de color verde claro a azul-grisáceo, en ocasiones rojiza. Llega medir hasta 6 m de altura. Las hojas son láminas casi orbiculares, de 10 a 60 cm de diámetro, profundamente palmatilobada, las divisiones ovado-oblongas a lanceoladas, agudas o acuminadas, el borde es irregularmente dentado-glanduloso; el pecíolo tan largo o más largo que la lámina y presenta glándulas entre la lámina y el pecíolo. Las flores masculinas tienen un perianto de 6 a 12 mm de largo, el de las flores femeninas de 4 a 8 mm de largo. El ovario está densamente cubierto por largos tubérculos blandos, que parecen pelos gruesos. El fruto es una cápsula subglobosa, de 1.5 a 2.5 cm de largo, con espinas cortas y gruesas (equinado); las semillas son elipsoidales aplanadas, de 10 a 17 mm de largo, lisas, brillantes, frecuentemente jaspeadas de café y gris, conspicuamente carunculadas. Se considera ruderal y además es cultivada, su ciclo de vida es anual o perenne. Su origen es probablemente africano y se encuentra ampliamente distribuido en los trópicos. Su distribución en México abarca los siguientes estados: Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Yucatán. Esta especie vegetal tiene diversos usos como: los tallos se utilizan para la fabricación de papel; las semillas

tienen importancia económica; se extrae el aceite de ricino o de castor, que se utiliza como producto medicinal, pero también como lubricante técnico importante para la manufactura de jabones y tinturas (Vibrans, 2005).



Figura 1. *Ricinus communis* L.

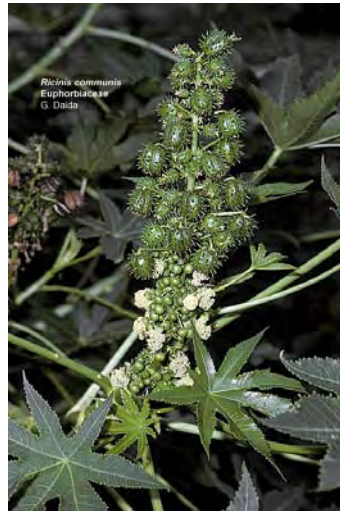


Figura 2. Frutos de *Ricinus communis* L.

2.7 *Reseda luteola* L.

Reseda luteola L. pertenece a la familia Resedaceae, es una hierba sin tricomas, es erecta y alcanza un tamaño de 40 a 100 cm de alto. El tallo es simple o ramificado. Las hojas presentan una forma de roseta basal cuando son jóvenes, en la mayoría las hojas son sésiles y se estrechan en la base. Las hojas maduras son lineares o lanceoladas, de 2 a 12 cm de largo por 0.5 a 1.5 cm de ancho, enteras o en ocasiones onduladas. Su inflorescencia se presenta en racimos espiciformes, de 20 a 35 cm de largo, de muchas flores sobre pedicelos cortos. Sus flores son de color amarillento; sépalos 4, entre 1.5 y 2 mm de largo; pétalos amarillos, 4 o 5, laciniados (con incisiones paralelas formando segmentos largos), de 2 mm de largo (los más

cortos), hasta de 4 o 5 mm de largo (el más grande); estambres 20 a 30; ovario tricarpelar, unilocular. Su fruto es una cápsula subglobosa, de 4 a 6 mm de diámetro, abriéndose en el ápice por 3 o 4 dientes; semillas globoso-reniformes, oscuras, lisas, brillantes, de 1 mm de largo y hasta 0.9 mm de ancho, superficie lisa. Su raíz es napiforme. Se considera ruderal y arvense. Su ciclo de vida es anual o bianual. Se encuentra vegetativa de agosto a marzo, floreciendo de octubre a abril y fructificando de noviembre a junio. Su origen es europeo y su distribución en México abarca los estados: Aguascalientes, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala, Veracruz, Zacatecas. Se considera una especie melífera importante; contiene un colorante amarillo que se usó para teñir en la industria textil, por lo que se cultivó en algún tiempo (Vibrans, 2005).



Figura 3. Planta joven de *Reseda luteola* L.



Figura 4. *Reseda luteola* L.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Probar la capacidad de acumulación de Cr VI en *Ricinus communis* y *Reseda luteola*, con la finalidad de proponer a estas especies vegetales como candidatas en el uso de procesos de fitorremediación.

3.2 Objetivos particulares

- Establecer condiciones óptimas de germinación para las semillas de *Ricinus communis*.
- Establecer cultivos hidropónicos y en suelo.
- Determinar la tolerancia a Cr durante la geminación de las semillas de las plantas.
- Montaje de un sistema experimental para las pruebas de bioacumulación en plantas jóvenes.
- Cuantificar el metal acumulado en diferentes órganos de las plantas.
- Determinar el mejor inóculo para inducir asociación con micorrizas en estas especies.

4 METODOLOGÍA

4.1 Estrategia desarrollada

Este estudio se realizó en tres etapas (Figura 1): de gabinete, de campo y de laboratorio.

A) Gabinete:

Se determinó el estado del arte en cuanto al empleo tecnológico de especies vegetales y micorrizas en biorremediación; también se realizó un estudio de herbario para conocer la distribución y las características generales de los lugares en donde se desarrollan las plantas que se emplearon en este trabajo.

B) Campo:

Se seleccionaron tres sitios para la colecta de semillas, esporas de hongos micorrizógenos y raíces micorrizadas.

C) Laboratorio:

Se llevó a cabo la determinación de las condiciones óptimas de germinación para *Ricinus communis*. Se realizaron pruebas de germinación para ambas especies, con la adición de diversas concentraciones de Cr VI y se determinó la tolerancia y acumulación de plantas jóvenes Cr VI. También se probaron diferentes tipos de inóculo para llevar a cabo la asociación micorrícica.

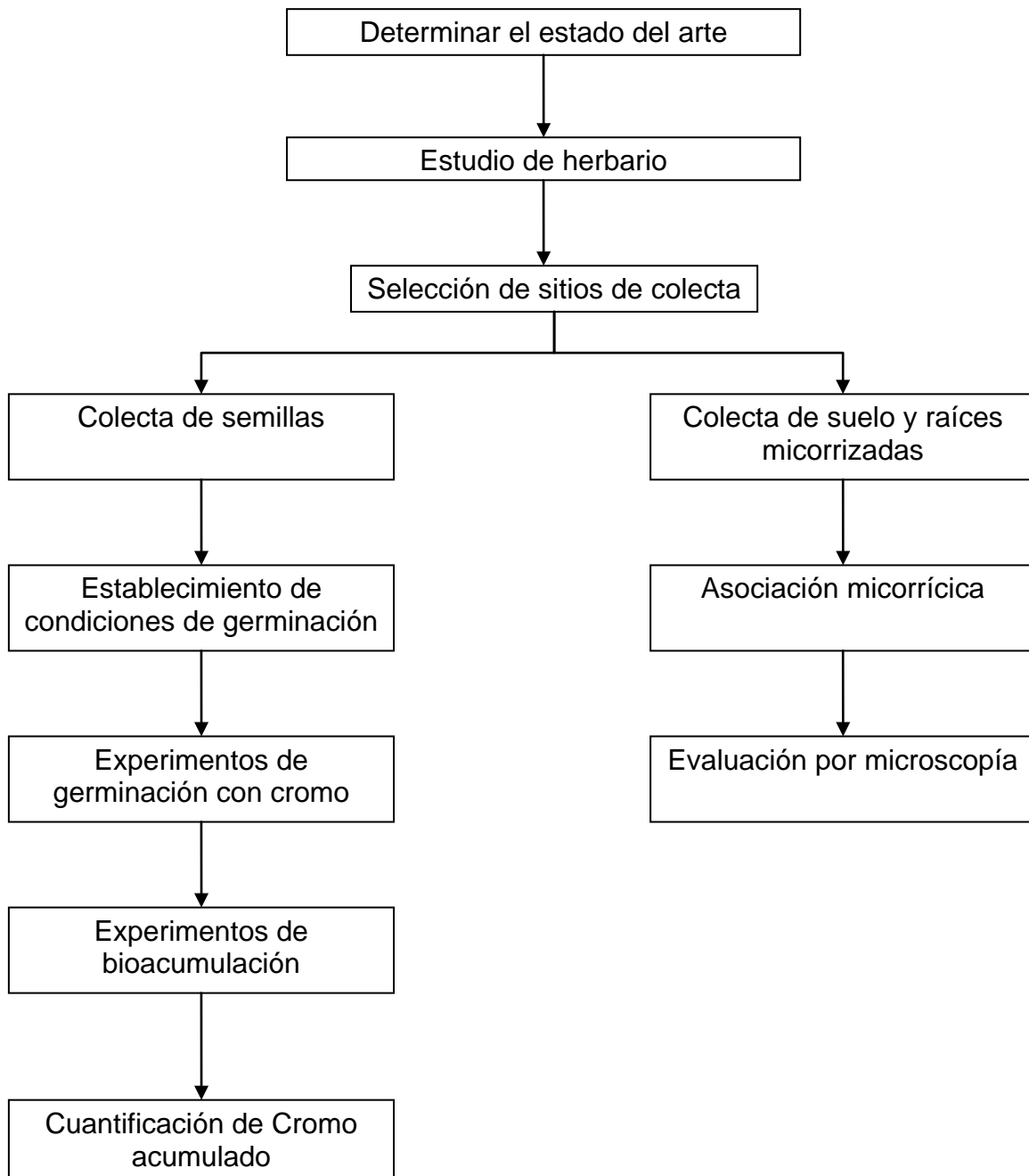


Figura 5. Estrategia desarrollada

4.2 Estudio de herbario

La investigación de herbario se realizó en el mes de agosto del 2006 en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM (MEXU). La información recabada acerca de *Ricinus communis* y *Reseda luteola* fue: tipo de suelo, altitud, hábitat; así como la altura que alcanzan estas plantas, las principales localidades en donde se han colectado y los usos.

4.3 Selección de sitios de colecta

En base a la información obtenida en el estudio de herbario, se seleccionaron tres sitios de colecta. Las semillas se recolectaron en la zona industrial del municipio de Tultitlán en el Estado de México y la zona chinampera del pueblo de San Luis Tlaxialtemalco en Xocimilco, D. F. Por otro lado, la recolección de esporas y raíces micorrizadas se llevo a cabo en La Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, con base en la información previamente adquirida de estudios que se han realizado acerca de la caracterización de hongos micorrizógenos arbusculares.

4.4 Colecta de material biológico

4.4.1 Semillas

Las semillas de *Reseda luteola* se colectaron en julio del 2007 y las semillas de *Ricinus communis* se colectaron en el mes de agosto del 2007, se limpiaron y se colocaron en bolsas de papel para almacenar en el refrigerador.

4.4.2 Esporas y raíces micorrizadas

Se obtuvieron muestras de suelo y raíces de diferentes especies vegetales, en el mes de agosto de 2007, éstas se almacenaron en bolsas de plástico para su uso inmediato en el proceso de aislamiento de esporas y la obtención de raíces micorrizadas.

4.5 Establecimiento de condiciones de germinación.

4.5.1 *Ricinus communis*

Las semillas se escarificaron mecánicamente con una navaja y se colocaron en recipientes con agrolita húmeda. Se establecieron 4 lotes con 10 semillas que se sometieron a diferentes condiciones: 1) Con luz intensa a 20° C; 2) en oscuridad a 20° C; 3) con luz intensa a 35° C y 4) en oscuridad a 35° C; en un tiempo de 6 días. Transcurrido el tiempo, se contó el número de semillas que germinaron en ese período y se obtuvo el porcentaje de germinación.

4.5.2 *Reseda luteola*

Las semillas se lavaron con agua corriente y solución jabonosa, después para la desinfección de éstas, se les añadió una solución de hipoclorito de sodio al 30% por 20 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril. La siembra se realizó en condiciones estériles y en cajas Petri con medio semisólido MS con la mitad de

macronutrientes (Anexo 1). Las semillas se incubaron a una temperatura de 25° C y un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

4.6 Experimentos de germinación con Cr

4.6.1 *Ricinus communis*

Las semillas se escarificaron mecánicamente y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 30% por 10 minutos, después se sembraron en envases con agrolita húmeda con una solución de medio MS modificado (Anexo 2), que se utilizó para el riego en cultivos hidropónicos, adicionada con diferentes concentraciones de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$): 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 125 μ M, 150 μ M, 175 μ M y 200 μ M. Se realizaron 5 repeticiones por tratamiento con 5 semillas en cada recipiente. Las semillas se colocaron a una temperatura de 35° C con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. La respuesta se evaluó después de 5 días. Se consideraron germinadas las semillas con la emergencia de radícula.

4.6.2 *Reseda luteola*

Se procedió de acuerdo con el apartado 4.5.2, para la germinación de esta especie vegetal, además se adicionaron diferentes concentraciones de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$): 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 125 μ M, 150 μ M, 175 μ M y 200 μ M. Se realizaron 5 repeticiones con 10 semillas en cada caja Petri. Se colocaron a una

temperatura de 25° C y un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad por 10 días.

4.7 Experimentos de bioacumulación

En *Ricinus communis* se formaron dos lotes: uno con plantas que germinaron en concentraciones de $K_2Cr_2O_7$ (de acuerdo a las condiciones expuestas en el apartado 4.6.1) y otro con plantas que germinaron en condiciones normales. En el caso de *Reseda luteola* se utilizaron sólo plantas que germinaron en condiciones normales *in vitro*. Para ambas especies estudiadas se establecieron cultivos hidropónicos usando como sustrato agrolita, se regaron con una solución de medio MS modificado (Anexo 2). A los tres meses de edad, a las plantas se les añadieron diferentes concentraciones de $K_2Cr_2O_7$ en la solución empleada para el riego: 600µM, 800µM, 1000µM y 1500µM; Se hicieron seis repeticiones por tratamiento, las plantas se regaron tres veces por semana, durante 10 días. Transcurrido este tiempo, se cosecharon y se lavaron con abundante agua destilada para eliminar el sustrato de las raíces, además para asegurar que no quedaran residuos del metal en la superficie de la raíz, se lavaron las plantas con una solución de Na EDTA al 20%. Posteriormente se secaron en un horno a una temperatura de 60 ° C por 48 horas. Después se separaron raíces y parte aérea. Los tejidos secos se molieron en mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino.

4.8 Cuantificación de cromo acumulado en los tejidos de las plantas

4.8.1 Digestión

La determinación de Cr en los tejidos vegetales se realizó de acuerdo al método EPA 3052. Se pesaron 0.2 g de cada muestra de tejido, el análisis se realizó por triplicado. Las muestras se colocaron en vasos de teflón y a cada uno se le agregó 5 ml de ácido nítrico y 5 mL de ácido clorhídrico. La digestión se realizó calentando las muestras en el horno de microondas (marca Marx) a 190° C por 10 minutos empleando veinte minutos de intervalo desde la temperatura ambiente hasta la temperatura final. Las muestras se enfriaron por 30 minutos a temperatura ambiente. El material digerido se filtró con papel filtro (Whatman No. 42). Y el líquido resultante se vació en matraces volumétricos y se aforó a 50 mL con una solución de ácido nítrico al 3%.

4.8.2 Determinación de pH y potencial redox (Eh)

Una vez que se concluyó el experimento de bioacumulación, se realizó un extracto (2:1), dos partes de agua y uno de sustrato (agrolita), para establecer el pH y Eh con la finalidad de ubicar estos datos en un diagrama de Pourbaix para determinar las especies de Cr presentes.

4.8.3 Determinación de cromo acumulado

La determinación del cromo acumulado en las especies de plantas se obtuvo por medio de espectrofotometría de absorción atómica de las muestras que fueron digeridas. La determinación de Cr se realizó en un espectrofotómetro de absorción atómica (Varian SpectraAA 880).

4.9 Asociación micorrícica

Para llevar a cabo la asociación micorrícica se utilizaron dos tipos de inóculo, que fueron las raíces micorrizadas y las esporas aisladas de muestras de suelo.

4.9.1 Obtención de esporas

Para la obtención de las esporas se utilizó el método de tamiz propuesto por Gerdeman y Nicholson, 1963 (Anexo 3), las esporas no se aislaron por completo de la solución del suelo, la última solución del tamiz más fino se utilizó como inóculo. Se observó al microscopio la solución para comprobar la existencia de esporas. A cada maceta se añadieron 50 mL de la solución. Las plantas de *Ricinus communis* y *Reseda luteola* que fueron inoculadas, tenían tres meses de edad y se establecieron en condiciones de hidroponía utilizando como sustrato agrolita.

4.9.2 Raíces micorrizadas

Para este tipo de inóculo, las raíces se lavaron con agua corriente inmediatamente después de ser colectadas, hasta quitar el exceso de suelo, posteriormente se les aplicó una solución de hipoclorito de sodio al 10% por 2 minutos, se enjuagaron con agua destilada y se cortaron en fragmentos de 3 a 5 cm de longitud. A Cada maceta se le agregaron 10 g de raíces. Las plantas de *Ricinus communis* y *Reseda luteola*, que fueron inoculadas tenían tres meses de edad y se establecieron en condiciones de hidroponía utilizando como sustrato agrolita.

4.9.3 Evaluación de estructuras micorrícicas por microscopía

Después de un mes de que plantas fueron inoculadas, se realizó una observación de las raíces para comprobar si la asociación se había llevado a cabo. Se cosecharon las raíces y se lavaron con agua destilada abundante para eliminar el sustrato, se tomó una muestra de cada individuo y se tiñó con azul de tripano (Anexo 4). Las raíces teñidas se observaron al microscopio óptico.

4.9.4 Análisis estadístico

A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza y la prueba de Tukey, usando el software GraphPad Prism 5.0 ®. Los datos del porcentaje de germinación fueron transformados con la función raíz cuadrada del arco seno previo al análisis de varianza, $\text{sen}^{-1}\sqrt{p/100}$, donde p es el porcentaje de germinación (Sokal y Rohlf, 1981).

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Estudio de herbario

El resultado de la investigación de herbario mostró que *Ricinus communis* y *Reseda luteola* presentan una amplia distribución en el país (Tabla 1), se les encuentra creciendo en diversos sitios con condiciones edáficas y climáticas muy diversas. Se localizan también en lugares que han sido alterados por las actividades realizadas por el ser humano. Esto nos lleva a plantear que este tipo de plantas ha tenido una adecuación a ambientes que han sido perturbados.

Ricinus communis es un arbusto que alcanza una gran altura y produce abundante biomasa, una número muy alto de semillas y experimenta crecimiento rápido. Las raíces de las plantas suelen ser grandes y vigorosas. Estas características se han tomado en cuenta en diversos trabajos de Fitorremediación (Garbisu y Alkorta, 2001) para designar a estas plantas con un gran potencial para acumular metales pesados y compuestos orgánicos.

Ricinus communis pertenece a la familia Euphorbiaceae, la cual se ha considerado, en los trabajos de Ensley *et al*, 1997, como una de las familias tropicales que tiene más especies identificadas como hiperacumuladoras de ciertos contaminantes.

Reseda luteola tiene también predilección por sitios perturbados, produce una gran cantidad de semillas, forma poblaciones numerosas en diferentes tipos de suelo y climas, además, tiene la capacidad de desarrollarse en un amplio rango de altitudes. No es una planta muy grande, sin embargo, es muy resistente a la contaminación.

Tabla 1. Distribución y condiciones de desarrollo de *Ricinus communis* y *Reseda luteola* obtenidos del Herbario Nacional (MEXU)

Especie	Distribución	Altitud	Altura	Características del lugar en donde se colecto	Usos
<i>Ricinus Communis</i>	Se ha colectado en la mayoría de los estados del país excepto en Nuevo León y Coahuila	Se encuentra desde los 10 – 3000 msnm	Alcanza una a altura de 0.30 hasta 6 m	Se ha encontrado creciendo en diferentes tipos de suelo, sitios perturbados, sitios con basura, cerca de cuerpos de agua contaminados, a la orilla de carreteras y laderas; en milpas y zonas agrícolas abandonadas	Las semillas se usan para la extracción de aceite que sirve medicinalmente como purgante
<i>Reseda Luteola</i>	Se ha colectado en gran parte del país excepto Baja California Norte y Sur, Sonora, Tamaulipas, Sinaloa, Colima, Aguascalientes, Nayarit, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Campeche, Quintana Roo y Yucatán	Se encuentra desde los 1400 a 2850 msnm	Alcanza una a altura de 0.40 hasta 1.5 m	Se ha encontrado creciendo en diferentes tipos de suelo, orilla de carreteras, zonas de cultivo y cerca de canales	Se menciona el uso de las flores como pigmento

5.2 Condiciones óptimas de germinación de *Reseda luteola* y *Ricinus communis*

Se consiguió establecer las condiciones óptimas de germinación para *Ricinus communis*. Se obtuvo un porcentaje de germinación de 100%, porcentaje muy alto, para tratarse de plantas silvestres (Tabla 2). Las condiciones óptimas de germinación para *Ricinus communis* fueron: escarificación mecánica, condiciones de luz, temperatura de 35 ° C. Para *Reseda luteola*: imbibición por 2 horas, condiciones de luz y temperatura de 25 ° C. Las semillas de *Ricinus communis* germinaron en 6 días y las de *Reseda luteola* en 8 días. La condición limitante para la germinación de *Reseda luteola* fue la presencia de iluminación y en el caso de *Ricinus communis*, la escarificación mecánica y la temperatura.

Tabla 2. Condiciones óptimas de germinación para *Ricinus communis* y *Reseda luteola*

Especie	Fotoperíodo	Temperatura	Requerimientos específicos
<i>Ricinus communis</i>	16 h luz/ 8 h oscuridad	35 °C	Escarificación mecánica
<i>Reseda luteola</i>	16 h luz/ 8 h oscuridad	25 °C	Imbibición por dos horas

No se han encontrado trabajos previos de germinación de *Ricinus communis* por lo cual ésta es una de las aportaciones que hace el presente estudio, ya que es un paso indispensable para la domesticación y el aprovechamiento de esta especie vegetal.

5.3 Tolerancia a Cr durante la germinación

Tanto las semillas de *Ricinus communis* como las de *Reseda luteola* lograron germinar en todas las concentraciones de $K_2Cr_2O_7$ probadas. Además el porcentaje de germinación fue alto y no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 3). En el caso de *Ricinus communis* hubo individuos (en todas las concentraciones) que lograron seguir su desarrollo. Este es un sistema que permite hacer selección de individuos tolerantes a Cr. Las plantas sobrevivientes se emplearon en experimentos de bioacumulación, para comparar su eficiencia de acumulación de cromo en comparación con las semillas que no fueron seleccionadas.

Tabla 3. Porcentaje de germinación de semillas de *Ricinus communis* y *Reseda luteola* sometidas a diferentes concentraciones de $K_2Cr_2O_7$

Tratamiento	<i>Ricinus communis</i>		<i>Reseda luteola</i>	
	% de Germinación	Longitud de raíz	% de Germinación	Longitud de raíz
0 μ M	100 \pm 13.43 ^a	3.50 \pm 1.78 ^a	68 \pm 17.6 ^a	1.25 \pm 1.01 ^a
25 μ M	88 \pm 0 ^a	4.75 \pm 1.14 ^a	52 \pm 14.8 ^a	0.84 \pm 0.55 ^b
50 μ M	100 \pm 8.16 ^a	1.80 \pm 0.73 ^b	52 \pm 6.56 ^a	0.38 \pm 0.23 ^b
75 μ M	100 \pm 11.61 ^a	2.05 \pm 0.76 ^b	60 \pm 19.25 ^a	0.27 \pm 0.11 ^b
100 μ M	100 \pm 11.61 ^a	2.00 \pm 0.60 ^b	56 \pm 14.47 ^a	0.70 \pm 0.40 ^b
125 μ M	96 \pm 0 ^a	1.25 \pm 0.66 ^b	76 \pm 23.11 ^a	0.31 \pm 0.08 ^b
150 μ M	96 \pm 11.61 ^a	1.70 \pm 0.78 ^b	62 \pm 20.08 ^a	0.27 \pm 0.06 ^b
175 μ M	96 \pm 8.16 ^a	1.43 \pm 0.82 ^b	46 \pm 18.58 ^a	0.27 \pm 0.05 ^b
200 μ M	96 \pm 11.61 ^a	1.15 \pm 0.44 ^b	46 \pm 13.55 ^a	0.25 \pm 0.09 ^b

Media \pm desviación estándar.

Los datos del porcentaje fueron transformados con la función raíz cuadrada del arco seno previo al análisis de varianza.

Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P<0.05).

En el caso de *Reseda luteola* muy pocas plantas sometidas a la presencia de $K_2Cr_2O_7$ lograron desarrollarse. Probablemente las semillas germinadas *in vitro* y posteriormente transplantadas a sistemas hidropónicos, no tuvieron el suficiente tiempo para adaptarse al nuevo ambiente antes de dar inicio a los experimentos con Cr, razón por la cual sería conveniente repetir estos experimentos en el futuro.

Se obtuvo un porcentaje de germinación alto, no obstante las plantas de ambas especies presentaron signos de estrés en las raíces, las cuales tuvieron un menor desarrollo. En las dos especies se observó que a medida que las concentraciones de $K_2Cr_2O_7$ aumentaron, las raíces tuvieron menor grosor y biomasa, y una disminución significativa de la longitud. A pesar de que las raíces se vieron afectadas, en el caso de *Ricinus communis*, hubo individuos que lograron completar su desarrollo.

El efecto dañino del Cr en las raíces se tradujo en una disminución significativa de la longitud de las mismas. En otros trabajos de germinación, se ha observado que la presencia de cromo inhibe la división celular en las células meristemáticas de la raíz y por lo tanto se afecta la elongación de ésta (Cervantes, *et al.*, 2001; Corradi *et al.*, 1993).

En la literatura se encontró que semillas expuestas a $K_2Cr_2O_7$ no presentan disminución en el porcentaje de germinación, sin embargo, la longitud y desarrollo de las raíces disminuye significativamente que es justo la respuesta

que presentaron las plantas estudiadas. En otros trabajos de germinación, las concentraciones de Cr empleadas son menores a las usadas en este trabajo. *Echinochloa colona* (2.5 mg/L) (Rout *et al.*, 2000); *Pisum sativum* (2.0 mM) (Bishnoi *et al.*, 1993); *Salvia sclarea* (5 mg/L) (Corradi *et al.*, 1993). Por ello, *Ricinus communis* y *Reseda luteola* tiene un amplio rango de tolerancia en comparación con estudios realizados en otras especies vegetales.

Estos rangos de tolerancia tan altos para la especie en la etapa de semilla, pueden indicar capacidades altas de tolerancia en etapas posteriores de desarrollo: plantas jóvenes y en estado de reproducción. Una mayor resistencia en la etapa adulta es el comportamiento general que hemos observado en otras especies vegetales.

La capacidad que presentan las semillas para germinar en presencia de elevadas concentraciones de Cr, sería una ventaja para llevar a estas especies a campo, en proyectos de recuperación de suelos contaminados, debido a que se sembraría directamente las semillas en el sitio afectado y no sería necesario que se desarrollen en condiciones de invernadero y posteriormente hacer trasplantes, ya que éstos implican que las plantas se sometan a un gran estrés.

5.4 Acumulación de cromo en diferentes órganos de las plantas

En primer lugar se observó que las plantas tratadas manifestaron signos de estrés durante el tiempo en el que se sometieron a la presencia de Cr. En *Ricinus communis* la biomasa fue decreciendo conforme aumentaron las concentraciones de Cr, además se observó estrés hídrico (Figura 6) evidenciado por la pérdida de rigidez de tallos y hojas. En *Reseda luteola* no se observó algún síntoma de toxicidad (Figura 7). Sin embargo, el peso seco de cada individuo disminuyó significativamente a partir de 600 μM (Tabla 5). Como aparentemente se estaba trabajando arriba de los límites de tolerancia a Cr que las plantas soportaban, los experimentos planeados para llevarse a cabo por 15 días (que es el tiempo que se estableció en otros estudios de acumulación de metales pesados por estas especies, en este grupo de trabajo) se redujeron sólo a 10 días de tratamiento con Cr.

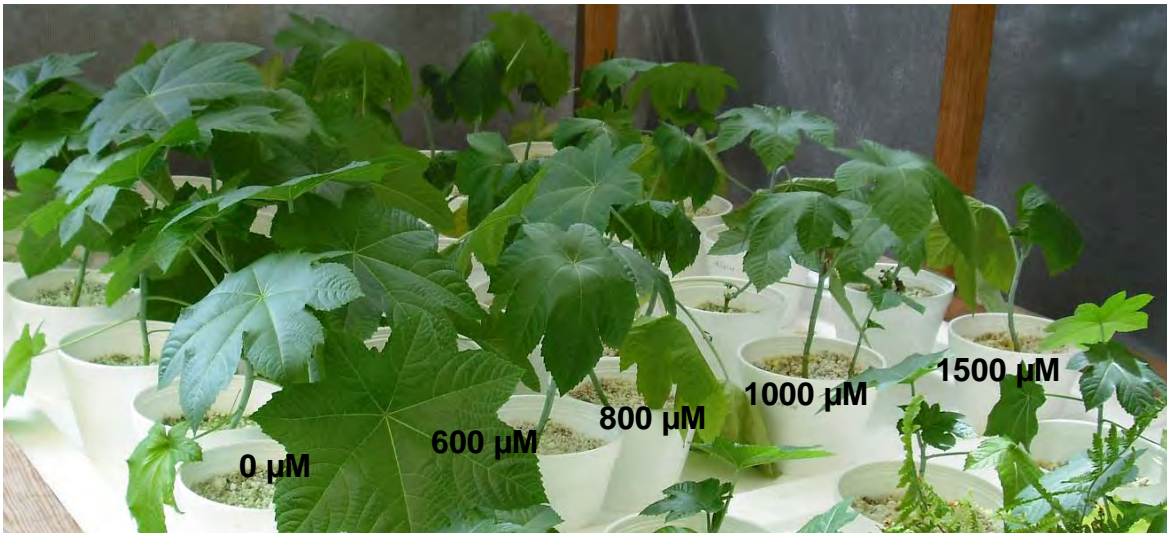


Figura 6. Plantas de *Ricinus communis* sometidas a diferentes concentraciones de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$



Figura 7. Plantas de *Reseda luteola* sometidas a diferentes concentraciones de $K_2Cr_2O_7$

Se ha determinado que el Cr causa daño principalmente en las raíces, ya que estas son las que se encuentran en contacto directo con el metal y por lo tanto suele ser el órgano más dañado. El efecto perjudicial del cromo en las raíces causa problemas de absorción de agua por la planta presenta deficiencias hídricas (Barceló, 1986). En otros trabajos también se ha observado la disminución significativa del peso seco en especies que crecieron en presencia de Cr (Rout *et al.*, 2000; Corradi *et al.*, 1993; Jamal *et al.*, 2006).

Tabla 4. Acumulación de Cr en raíz y partes aéreas de *Ricinus communis* y *Reseda luteola*

Tratamiento	<i>Ricinus communis</i>						<i>Reseda luteola</i>	
	Raíz (mg/kg)		Tallo (mg/kg)		Hoja (mg/kg)		Raíz (mg/kg)	Hoja (mg/kg)
	s/Cr	c/Cr	s/Cr	c/Cr	s/Cr	c/Cr		
600 µM	1989±584	1322±257	93±47	83±52	31±12	28±6	476±139	309±186
800 µM	1558±186	1783±206	35±8	69±13	38±3	29±2	524±317	242±104
1000 µM	2225±450	2851±63	160±163	179±43	38±11	55±6	588±213	626±433
1500 µM	1896±391	3251±236	341±152	296±240	128±22	95±54	491±282	1731±380

Media ± desviación estándar

s/Cr= plantas que germinaron sin Cr

c/Cr = plantas que germinaron con Cr

Tabla 5. Peso seco de plantas de *Ricinus communis* y *Reseda luteola* sometidas a diferentes concentraciones de Cr

Tratamiento	<i>Ricinus communis</i>			<i>Reseda luteola</i>	
	Raíz g	Tallo g	Hoja g	Raíz g	Hoja g
0 µM	0.56±0.14 ^a	0.55±0.15 ^a	1.25±0.23 ^a	0.06±0.07 ^a	0.014±0.12 ^a
600 µM	0.42±0.13 ^a	0.29±0.10 ^b	0.46±0.10 ^b	0.03±0.01 ^a	0.21±0.27 ^a
800 µM	0.40±0.09 ^a	0.32±0.10 ^b	0.52±0.19 ^b	0.06±0.04 ^a	0.16±0.10 ^a
1000 µM	0.25±0.15 ^b	0.23±0.07 ^b	0.34±0.15 ^b	0.06±0.04 ^a	0.14±0.70 ^a
1500 µM	0.35±0.11 ^a	0.26±0.07 ^b	0.35±0.12 ^b	0.08±0.04 ^a	0.41±0.58 ^a

Media ± desviación estándar

Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P<0.05).

Reseda luteola presentó translocación de Cr hacia las hojas. Las plantas de esta especie trasladaron el metal a la parte aérea a partir de 1000 µM de K₂Cr₂O₇. Según Shanker *et al.*, 2005, la mayoría de las plantas que acumulan grandes concentraciones de Cr, lo retienen en las raíces; sin embargo se da el caso de

que a través de ciertos mecanismos pueda ser transportado hacia la parte aérea, estos mecanismos se basan en la competencia del Cr con iones esenciales como: Fe, S y P para ser acarreados dentro de la planta, de esta manera el Cr puede ser transportado vía xilema. Sería muy interesante estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la translocación. Aunque hay algunas plantas con esta capacidad reportadas en la literatura generalmente los niveles de acumulación en los tejidos aéreos de las planta son muy bajos, niveles superiores a 1000 ppm son considerados muy altos. *Reseda luteola* fue capaz de acumular 1731 ppm cuando fue sometida a 1500 mM de $K_2Cr_2O_7$.

La capacidad de acumulación de Cr de *Ricinus communis* y *Reseda luteola* se encuentran dentro de los rangos promedio obtenidos para otras plantas que se consideran hiperacumuladoras de Cr: *Convolvulus arvensis* (3800 ppm en tallo, 2100 ppm hoja y en raíz. peso seco); *Salsola kali* (2900 ppm raíz, 790 tallo y 600 en hoja) (Gardea *et al.*, 2005); *Dicoma niccolifera* (1500 ppm en hojas) (Bini *et al.*, 2008); *Leptospermum scoparium* (2470 ppm peso seco total) (Shahandeh y Hossner, 2000); *Acacia arabica* (107 ppm en hoja y 459 ppm en raíz); *Populus euroamericana* (188 ppm en hoja y 538 ppm en raíz) (Khan, *et al.*, 2000). Es importante aclarar que los estudios mencionados no son comparables entre si porque la mayor parte de las veces son reportes de plantas colectadas en lugares contaminados y porque las condiciones experimentales son muy variables. Como se emplearon concentraciones altas de Cr y el suministro de las soluciones fue constante (condición que no suele encontrarse en suelos contaminados) las dos

especies estudiadas resultan muy prometedoras para efectuar procesos de biorremediación en campo.

Las plantas de *Ricinus communis* que fueron seleccionadas (que germinaron en presencia de Cr) muestran una menor variación en los resultados, en comparación con las plantas no seleccionadas (que no germinaron en presencia de Cr). Son una población mucho más homogénea en sus capacidades de retención de este metal y también presentan una mejora en la capacidad promedio de acumulación de cromo cuando son sometidas a concentraciones de cromo mayores de 1000 mM de $K_2Cr_2O_7$. Las raíces de las plantas tratadas acumularon 2851 ± 63 y 3251 ± 236 en el grupo seleccionado, contra 2225 ± 450 y 1896 ± 391 en las plantas no seleccionadas, a 1000 y 1500 μM de $K_2Cr_2O_7$ respectivamente.

En cuanto a la relación que existe entre el pH y Eh del sustrato de las plantas, nos indica la especie de metal que esta presente en la solución del sustrato. En ambos experimentos hubo una reducción de Cr VI a Cr III, pero las especies de Cr fueron diferentes, en *Ricinus communis* $CrOH^{2+}$ y en *Reseda luteola* $Cr(OH)_3$ (Figura 8). Los exudados de la raíces de las plantas favorecen la reducción de Cr VI a Cr III (Banks, M, *et al.*, 2006; Garbisu y Alkorta, 2001). Esta reducción es un mecanismo que las plantas utilizan para disminuir la toxicidad del metal y después lo inmovilizan en células de las raíces. *Ricinus communis* y *Reseda luteola* presentan este comportamiento típico, que es muy importante para el

destino, transporte y toxicidad del metal, mecanismo que depende de las reacciones de oxido-reducción (Garisu y Alkorta, 2001).

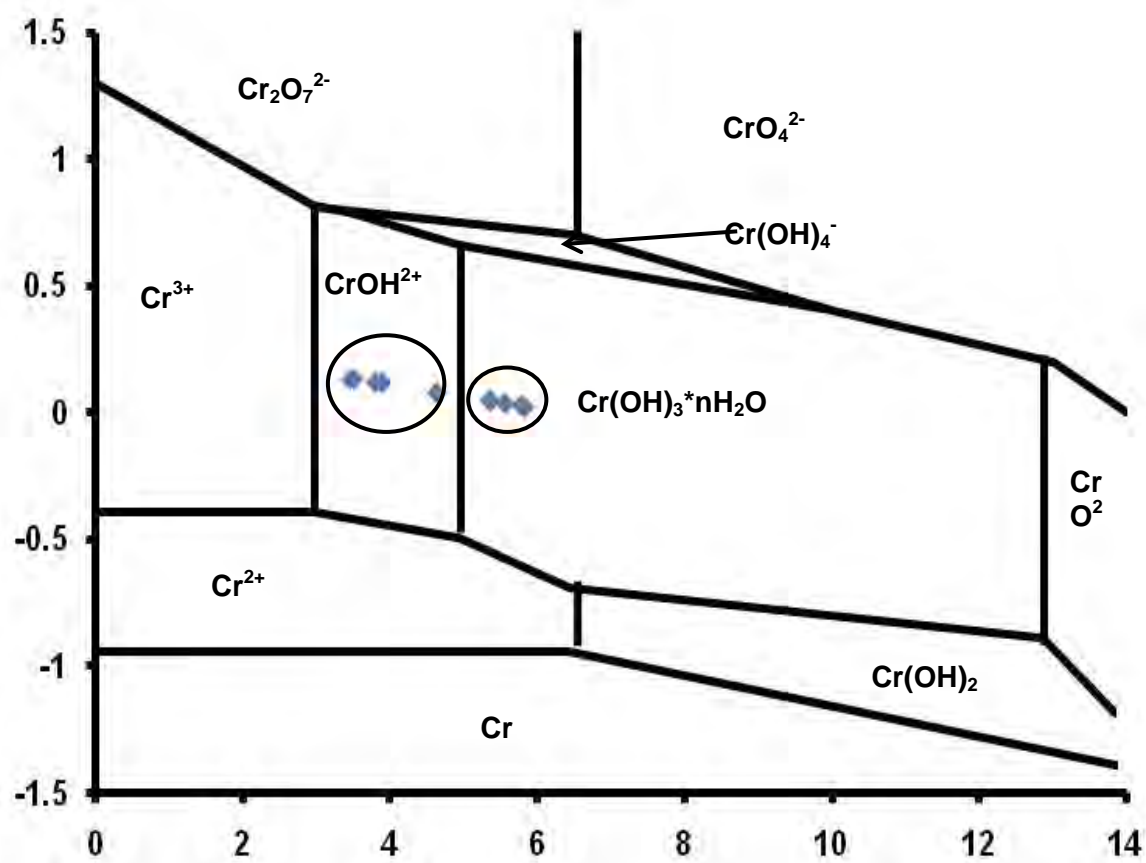


Figura 8. Diagrama de Pourbaix para las especies de Cr presentes en los experimentos de bioacumulación para *Ricinus communis* y *Reseda luteola*.

La mayoría de los metales se ven afectados por el pH, principalmente la especiación metálica, solubilidad, adsorción e intercambio de iones en el suelo. (Mc Bride et al., 1997; Kabata y Pendias, 2001; Reichman, 2002). Además afecta los procesos de ingreso del metal a las raíces de las plantas (Rieuwertts et al., 1998; Lasat, 2001). Según Mc Bride et al., 1997 el pH es el factor que afecta la disponibilidad de los metales. En cuanto al Eh se sabe que afecta el tipo de

especiación de los metales en la solución del suelo alterando su solubilidad (Patrick y Jugsujinda, 1992; Kabata y Pendias, 2001).

5.5 Asociación micorrícica

Al observar las raíces micorrizadas al microscopio se comparó la efectividad de la colonización de los dos tipos de inóculos empleados. Las plantas inoculadas con raíces micorrizadas presentaron un número mayor de estructuras fúngicas en comparación con las plantas inoculadas con esporas aisladas del suelo (Figura 9. C y D).

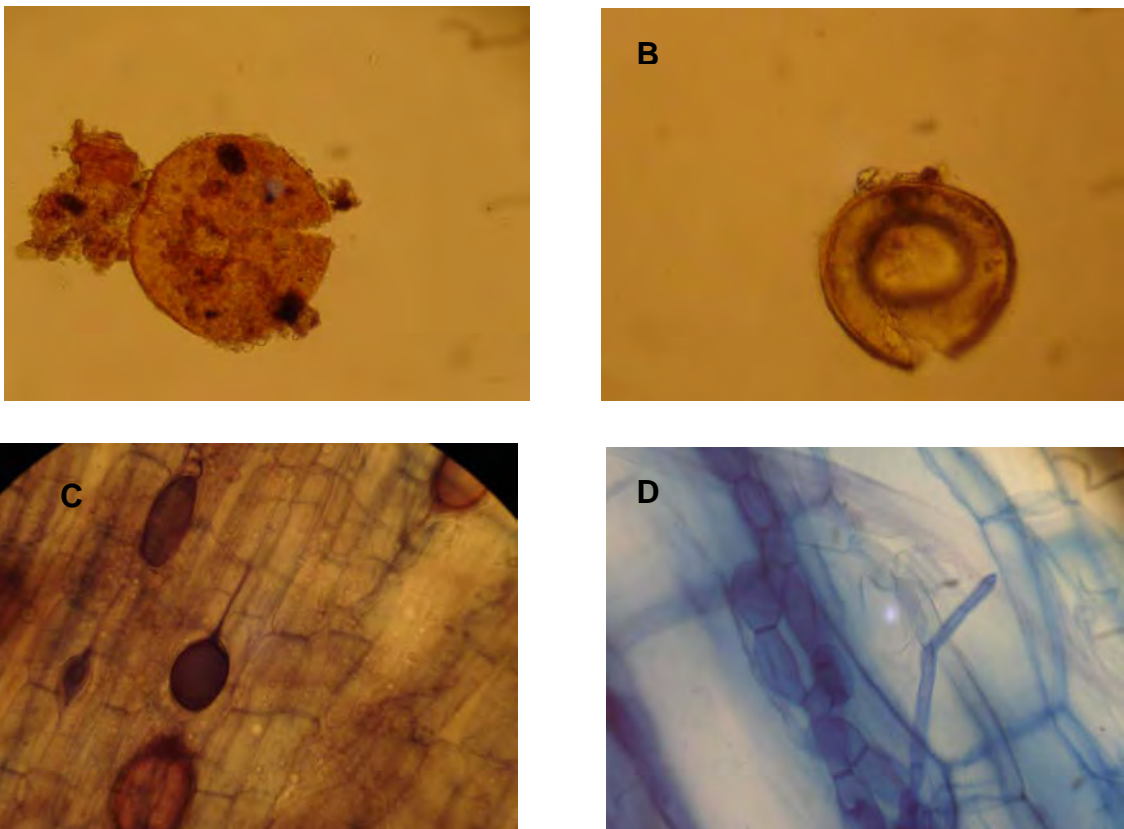


Figura 9. A y B. Esporas de hongos aisladas del suelo. C y D. Estructuras de hongos encontradas en las raíces de plantas inoculadas con raíces micorrizadas.

Tal vez la germinación de las esporas no ocurrió porque no se presentaron las condiciones adecuadas para iniciar una asociación con las plantas. Y en el caso de las raíces micorrizadas la asociación fue mas efectiva debido a la presencia de varias estructuras fúngicas, como las hifas y las esporas, que buscan a otro hospedero vivo para seguir con la asociación.

Estos resultados sugieren que para realizar una asociación exitosa, que permita un mayor porcentaje de colonización, es necesario mezclar los tipos de inóculo, de esta manera se puede mejorar la eficiencia de asociación de los hongos micorrizogenos con las raíces de las plantas. La intención de inducir en estas especies vegetales la asociación con micorrizas es la de probar en un futuro, el papel que juegan estos microorganismos, en tolerancia y capacidad de acumulación de metales pesados en estas plantas y otras plantas consideradas como hiperacumuladoras, debido a que se ha reportado en otros trabajos una mayor tolerancia a metales pesados, por plantas asociadas a hongos micorrizógenos (Khan, 2006; Wu *et al.*, 2006).

6 CONCLUSIONES

- Tanto *Reseda luteola* como *Ricinus communis* presentan una amplia distribución en el país y se adaptan a una amplia gama de condiciones ecológicas.
- Las condiciones óptimas de germinación de *Reseda luteola* fueron imbibición por dos horas, condiciones de luz y 25 °C.
- Las condiciones óptimas de germinación de *Ricinus communis* fueron escarificación mecánica, condiciones de luz y temperatura de 35 °C.
- Las semillas de las dos especies estudiadas tienen la capacidad de germinar en altas concentraciones de Cr VI. Aunque se presentan síntomas de toxicidad en la raíz, en todas las concentraciones probadas hay plantas sobrevivientes que pueden continuar su desarrollo.
- En *Ricinus communis* la mayor acumulación de cromo se presentó en las raíces.
- En *Reseda luteola* se presentó un comportamiento atípico, la mayor acumulación de cromo se presentó en las hojas a partir de 1000 μM de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.
- La capacidad de acumulación de Cr por *Ricinus communis* y *Reseda luteola* se encuentran dentro de los rangos promedio obtenidos por plantas que se consideran hiperacumuladoras de Cr.
- Las plantas seleccionadas de *Ricinus communis* son una población mucho más homogénea en sus capacidades de retención y acumulación de cromo.

- La selección de individuos tolerantes en la etapa de germinación puede ser un mecanismo valioso para obtener variedades vegetales de estas especies con capacidades homogéneas de respuesta ante metales pesados.
- En los experimentos de bioacumulación con las dos especies vegetales hubo una reducción de Cr VI a Cr III.
- Las plantas de *Reseda luteola* y *Ricinus communis* inoculadas con raíces micorrizadas presentaron un número mayor de estructuras fúngicas en comparación con las plantas inoculadas con esporas aisladas del suelo.
- Para realizar una asociación más exitosa, que permita un mayor porcentaje de colonización, es necesario mezclar los tipos de inóculo, de esta manera se puede mejorar la eficiencia de asociación de los hongos micorrizógenos con las raíces de las plantas.
- Las especies estudiadas tienen una gran capacidad de acumulación de cromo y pueden ser excelentes candidatos para realizar estudios de fitorremediación en campo.
- Las capacidades de translocación de cromo de *Reseda luteola* la hacen un excelente modelo para estudiar los mecanismos bioquímicos y genéticos involucrados en la acumulación y transporte de Cr en tejidos vegetales.

7 ANEXOS

Anexo 1. Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con la mitad de macronutrientes.

Clasificación	Compuesto	mg·l ⁻¹
Macronutrientes	(NH ₄)NO ₃	825
	KNO ₃	950
	MgSO ₄ 7H ₂ O	185
	KH ₂ PO ₄	87.5
	CaCl ₂ 2H ₂ O	220
	FeSO ₄ 7H ₂ O	13.9
	Na ₂ EDTA	18.65
Micronutrientes	MnSO ₄ H ₂ O	16.9
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6
	H ₃ BO ₃	12.4
	KI	0.82
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.00024
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.000024
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.000024
Compuestos orgánicos	Tiamina	0.10
	Ac. Nicotínico	5
	Piridoxina	5
	Myo-inositol	100
	Glicina	2
	Sacarosa	30000
	Agar	9000

pH ajustado a 5.7

Anexo 2. Medio MS modificado, utilizado para el riego de cultivos hidropónicos.

Clasificación	Compuesto	mg·l⁻¹
Macronutrientes	(NH ₄)NO ₃	825
	KNO ₃	950
	MgSO ₄ 7H ₂ O	185
	KH ₂ PO ₄	87.5
	CaCl ₂ 2H ₂ O	220
	FeSO ₄ 7H ₂ O	13.9
	Na ₂ EDTA	18.65
Micronutrientes	MnSO ₄ H ₂ O	16.9
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6
	H ₃ BO ₃	12.4
	KI	0.82
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.00024
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.000024
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.000024

Anexo 3. Técnica de tamizado húmedo para la separación de esporas del suelo (Gerdemann y Nicolson, 1963) modificada.

1. Pesar 100 g de suelo.
2. Colocarlo en un vaso de precipitado de un litro y se agrega agua, se revuelve tratando de disolver la mayor cantidad de agregados y se deja reposar por 10 minutos.
3. Se filtra por una serie de tamices.
4. En este caso la modificación es que se omitió la centrifugación.

Anexo 4. Tinción de raíces con azul de tripano (Phillips y Hayman, 1970)

1. Las raíces se lavan con agua corriente para quitar el exceso del sustrato.
2. Se agrega KOH al 10% hasta cubrir las raíces, se colocan en baño maría a 80 °C por 20 minutos y se enjuagan con agua destilada.
3. Se agrega H₂O₂ al 10% por 3 minutos y se enjuaga con agua destilada.
4. Se agrega HCl al 10% por 3 minutos y se elimina el ácido sin enjuagar.
5. Se agrega azul de tripano al 0.05%, se coloca a baño maría a 80 °C por 15 minutos.
6. Las raíces se colocan en lactoglicerol para quitar el exceso de azul de tripano

8 Bibliografía

- Anton, D., (2000). Diversidad, globalización y la sabiduría de la naturaleza. Ed. IDRC/Piriguazú, Costa Rica, 302 p.
- Banks, M., Schwab, A. y Henderson, C. (2006). Leaching and reduction of chromium in soil as affected by soil organic content and plants. *Chemosphere*, 62: 255-264.
- Barceló, J., (1986). Water Relations of Chromium VI Treated Bush Bean Plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv Contender) under both Normal and Water Stress Conditions. *J. Exp. Bot.*, 37: 178-187.
- Bautista, F., (1999). Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados. Ed. UADY, 109 p.
- Bini, C, et al. (2008). The chromium issue in soils of the leather tannery district in Italy. *Journal of Geochemical Exploration*, 96: p. 194-202
- Bishnoi, N., Dua, A., Gupta, V. y Sawhney, S., (1993). Effect of chromium on seed germination, seedling growth and yield of peas. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 47: 47-57.
- Bonaventura, C. y Johnson, F., (1997). Healthy environments for healthy people: bioremediation today and tomorrow. *Environ. Health. Perspect.* 105: 5-20.
- Cervantes, C., Campos, J., Devars, S., Gutiérrez, F., Loza, H., Torres, J. y Moreno, R., (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 335-347.
- Cervantes, C. y Moreno, R., (1999). Contaminación ambiental por metales pesados: impacto en los seres vivos. AGT editor, S. A, México, 157 p.
- Chandra, P. y Kulshreshtha, K., (2004). Chromium Accumulation and Toxicity in Aquatic Vascular Plants. *The Botanical Review*, 70(3): 313-327.
- Cobbett, C., (2003). Heavy metals and plants-model systems and hyperaccumulators. *New Phytologist*, 159: 289-293.
- Coll, A., Sánchez, M. y Morales J., (2001). La minería en México. Geografía, historia, economía y medio ambiente. Instituto de Geografía, UNAM, 126 p.

- Corradi, M., Bianchi, A. y Albasini, A., (1993). Chromium toxicity in *Salvia sclarea*. Effects of hexavalent chromium on seed germination and seedling development. *Environmental and Experimental Botany*, 33 (3): 405-413.
- Eapen, S. y D'Souza, S., (2005). Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology Advances*, 23: 97–114.
- Ernst, W., (1996). Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. *Applied Geochemistry*, 11: 163-167.
- Garbisu, C. y Alkorta, I., (2001). Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technol.* 77: 229-236.
- Gardea, J., De la Rosa G., Peralta, J., Montes, M., Cruz, G. y Cano, I.,(2005). Differential uptake and transport of trivalent and hexavalent chromium by tumbleweed (*Salsola kali*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48: 225-232.
- Gerdemann, J. y Nicolson, T., (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46: 234-244.
- Gupta, S., (1992). Mobilizable metal in anthropogenic contaminated soils and its ecological significance. In *Impact of heavy metals on the environment*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 299–310.
- Hernández, L., Castillo, S., Guadarrama, P., Martínez, Y., Romero, M. y Sánchez, I., (2003). Hongos micorrizógenos arbusculares del Pedregal de San Ángel. Facultad de Ciencias, UNAM, 77 p.
- Jamal, S., Iqbal, M. y Athar, M., (2006). Phytotoxic effect of aluminum and chromium on the germination and early growth of wheat (*Triticum aestivum*) varieties Anmol and Kiran. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 3(4): 411-416.
- Jiménez, B., (2001). La contaminación ambiental en México. Editorial Limusa, México, 928 p.
- Kabata, A. y Pendias, H., (2001). Trace elements in soils and plants. CRC Press Inc., Boca Ratón, 3ª edición, Georgia, USA, 413 p.
- Khan, A., (2006). Mycorrhizoremediation- an enhanced form of phytoremediation. *J Zhejiang Univ Sci B*, 7(7): 503-514.
- Khan, A, *et al.* (2000). Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere*, 41: p. 197-207.

- Krämer, U. (2005). Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Curr Opin Biotechnol*, 16: 133-141.
- Lasat, M., (2001). The uses of plants for removal of toxic metal from contaminated soil. US-EPA.
- Litchfield, C. (2005). Thirty Years and Counting: Bioremediation in Its Prime? *BioScience*, 55(3): 273-279.
- Lombi, E., Zhao, F., Dunham, S. y McGrath, S. (2001). Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Soils: Natural Hyperaccumulation versus Chemically Enhanced Phytoextraction. *J. Environ. Qual.* 30: 1919-1926.
- Manahan, S., (2007). Introducción a la química ambiental. Ed. Reverté-UNAM, México, 725 p.
- Mc Bride, M., Sauve, S. y Herdershot, W., (1997). Solubility control of Cu, Zn, Cd y Pb in contaminated soils. *European J. Soil Sci.*, 48:337-346.
- Patrick, W. y Jugsujinda, A., (1992). Secuential eduction and oxidation of inorganic nitrogen, manganese ans iron in flooded soil. *Soil Scr. Soc. Of America J.*, 56: 1071-1073.
- Pawlowska, T. y Charvat, I. (2004). Heavy-Metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(11): 6643-6649.
- Phillips J. y Hayman, D., (1970). Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesssment os infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 55: 158-161.
- Rana, S., (2006). Environmental Pollution: Health and Toxicology. Alpha Science Int'l Ltd, 269 p.
- Raskin, I. y Ensley, B., (2000). Phytoremediation of toxic metals. Ed, Jonh Wiley & Sons, Inc. E.U.A, 300 p.
- Reichman, M., (2002). The responses of plants to metals toxicity: A review focusing on copper, manganese and zinc. Australian Minerals and Energy Environ Foundation. 54.
- Rieuwerts, J., Thonton, H., Farago, M. y Ashmore, M., (1998). Factors influencing metals bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. *Chemical Speciation and Bioavilability*, 10(2): 61-75.

- Rout, G., Samantaray, S. y Das, P., (2000). Effects of chromium and nickel on germination and growth in tolerant and non-tolerant populations of *Echinochloa colona* (L.) Link. *Chemosphere*, 40: 855-859.
- Shahandeh, H. y Hossner, L., (2000). Enhancement of Cr (III) phytoaccumulation. *Inter. Jour. Phytor.*, 2(3): 269-286.
- Shanker, A., Cervantes, C., Loza, H. y Avudainayagam, S., (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment International*, 31: 739-753.
- Shützendübel, A. y Polle, A., (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1351-1365.
- Smith, S., Read, D y Harley, J., (1997). Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, U.S.A., 605 p.
- Sokal, R. y Rohlf, J., (1981). Biometry. W.H. Freeman Co., California, E.U.A., 859 p.
- Solís, L. y López, J., (2003). Principios básicos de contaminación ambiental. Ed. UAEM, México, 397 p.
- Vibrans, H., (2005). *Ricinus communis* L., http://www.conabio.gob.mx/malezasde_mexico/euphorbiaceae/ricinus-communis/fichas/ficha.htm, (consulta: 7 de febrero del 2009).
- Vibrans, H., (2005). *Reseda luteola* L., http://www.conabio.gob.mx/malezasde_mexico/resedaceae/reseda-luteola/fichas/ficha.htm, (consulta: 7 de febrero del 2009).
- Volke, T., Velasco, J. y De la Rosa, D., (2005). Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Instituto Nacional de Ecología, 144 p.
- Wu, C., Wood, T., Mulchandani, A. y Chen, W., (2006) Engineering plant-microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metals. *Appl Environ Microbiol*, 72(2): 1129-113.