



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

MECANISMOS DE RESISTENCIA Y
ACUMULACIÓN DE CROMO Y PLOMO
EN *Pteridium aquilinum* (L.) KUHN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

FELIPE DE JESÚS ESLAVA SILVA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MANUEL JIMENEZ ESTRADA

COMITÉ TUTOR: DR. RAFAEL MORENO SANCHÉZ
DRA. TERESA I. FORTOUL VAN DER GOES

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/319/12

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **21 de mayo de 2012** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **ESLAVA SILVA FELIPE DE JESÚS** con número de cuenta **302053960** con la tesis titulada **"Mecanismos de resistencia y acumulación de cromo y plomo en Pteridium aquilinum (L.) Kuhn"**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA**:

Presidente: DR. RICARDO REYES CHILPA
Vocal: DRA. SUSANA VALENCIA ÁVALOS
Secretario: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
Suplente: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
Suplente: DR. LUIS FELIPE JUÁREZ SANTILLÁN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de junio de 2012

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

MCAA/MJFM/ASR/grf*



Agradecimientos

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México la oportunidad y el apoyo que me otorgó durante la elaboración de mis estudios de Maestría.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca concedida que me permitió el inicio, desarrollo y culminación de este proyecto.

Agradezco de manera muy especial a mi Tutor Principal Dr. Manuel Jiménez Estrada, quien siempre apoyo este proyecto y nunca perdió la confianza en mi persona.

Y finalmente agradezco a los miembros de mi comité titorial, al Dr. Rafael Moreno Sanchez y a la Dra. Teresa I. Fortoul van der Goes quienes nutrieron esta investigación y a mí de manera muy grata y estricta.

Agradecimientos personales

Gracias a mis padres, Tomas y Herminia los quiero mucho.

Hermanita sabes que te adoro y quiero.

Alfredo, ¡gracias!

Cómplices, es decir mis amigos, no los enlistaré porque saben que son mis amigos cuando han terminado metidos en dramas, problemas y demás improperios por mi culpa. Y que a mí también me implicado en sus desmanes. Los amo.

Maestros, quienes sin conocerme me han brindado su conocimiento y con los años he recapitulado que ha sido mucho.

A la vida porque me ha dado más de lo que creía capaz de tener y yo espero pagarte aunque sea una fracción de ello.

¡Gracias!

Esta tesis está dedicada:

A quienes amo y por ellos cada día me esfuerzo por ser mejor hijo, mejor hermano, mejor pareja, mejor amigo, mejor persona y mejor profesionalista. Por quienes me hacen sentir que no importa si perdiera todo lo poseo pues mi vida seguiría estando llena si cuento con ellos, mis alientos y mis fuerzas.

1 Índice

1	Índice	1
2	Índice de tablas.....	4
3	Índice de figuras	5
4	Resumen.....	6
5	Abstract	9
6	Introducción	12
7	Marco teórico	14
7.1	Contaminación Ambiental.....	14
7.2	Contaminación por metales	15
7.3	Cr	16
7.4	Contaminación por Cr	17
7.5	Remediación.....	18
7.6	Biorremediación	18
7.7	Fitorremediación	19
7.8	Fitorremediación de Cromo.	21
7.9	Toxicidad de Cr en las plantas.....	22
7.10	Mecanismos de resistencia y acumulación de Cr en las plantas.....	23
7.10.1	Ácidos orgánicos.....	24
7.10.2	Aminoácidos	25
7.10.3	Proteínas	25
7.10.4	Biomoléculas con grupos sulfidrilos.....	25
7.11	Estado actual del estudio de los mecanismos de resistencia y acumulación a Cr en plantas.....	30

7.12	Helechos.....	30
7.13	<i>Pteridium aquilinum</i>	32
8	Hipótesis.....	34
9	Objetivo General.....	35
10	Objetivos particulares.....	35
11	Método.....	36
11.1	Estrategia desarrollada.....	36
11.2	Material biológico.	37
11.3	Propagación de <i>Pteridium aquilinum</i>	38
11.3.1	Medios de cultivo.....	38
11.3.2	Desinfección y siembra de esporas de <i>Pteridium aquilinum</i>	38
11.3.3	Cultivo de gametofitos.	38
11.3.4	Cultivo de esporofitos.	38
11.4	Tratamientos con $K_2Cr_2O_7$ a los que fueron expuestos la fase gametofítica y esporofítica de <i>Pteridium aquilinum</i>	39
11.5	Sensibilidad de la fase gametofítica y esporofítica de <i>Pteridium aquilinum</i> a Cr.	40
11.5.1	Biomasa.....	40
11.5.2	Contenido de clorofila a y b.	40
11.6	Contenido de Cr en ambas fases del ciclo de vida de <i>Pteridium aquilinum</i>	41
11.7	Cuantificación de cromatos y Cr total en los medios de cultivos de la fase gametofítica y esporofítica de <i>Pteridium aquilinum</i>	42
11.7.1	Determinación de cromatos en el medio de cultivo.	42
11.7.2	Cr total en los medio de cultivo.	43
11.8	Porcentaje de translocación, factor de bioacumulación, velocidad de acumulación y velocidad de remoción de Cr en <i>Pteridium aquilinum</i>	43

11.9	Cuantificación de cisteína, glutatión y fitoquelatinas en los tejidos de <i>Pteridium aquilinum</i>	44
11.10	Análisis estadístico	46
12	Resultados y discusión	47
12.1	Sensibilidad de la fase gametofítica y esporofítica de <i>Pteridium aquilinum</i> al Cr.	47
12.2	Bioacumulación de Cr en ambas fases del ciclo de vida de <i>Pteridium aquilinum</i>	54
12.2.1	Fase gametofítica.	54
12.2.2	Fase esporofítica.	59
12.3	Contenido de cisteína, glutatión y fitoquelatinas en los tejidos de <i>Pteridium aquilinum</i> .69	
12.3.1	Fase gametofítica.	69
12.3.2	Fase esporofítica.	74
12.3.3	Algunas consideraciones para ambas fases del ciclo de vida.	79
13	Conclusiones	82
13.1	Fase gametofítica	82
13.2	Fase esporofítica	82
13.3	Para ambas fases.....	83
14	Bibliografía.....	84
15	Anexos	94
15.1	Anexo 1. Medio de cultivo ½ MS.....	94
15.2	Anexo 2. Solución hidropónica.....	95

2 Índice de tablas

Tabla 1. Costo de los tratamientos de remediación de suelos contaminados por metales.	19
Tabla 2. Comparación entre <i>P. aquilinum</i> y las principales especies hiperacumuladoras de Cr.	62
Tabla 3. Relación entre contenido de glutatión+ γ -glutamil cisteína y el Cr total acumulado por la especie en la fase gametofítica.	74
Tabla 4. Relación entre contenido de glutatión+ γ -glutamil cisteína y el Cr total acumulado por la especie en la fase esporofítica.	79

3 Índice de figuras

Fig. 1. Ácidos orgánicos involucrados en la resistencia y acumulación de metales tóxicos en plantas.	24
Fig. 2. Ruta de asimilación del azufre en plantas.	26
Fig. 3. Ciclo de vida de <i>P. aquilinum</i>	33
Fig. 4. Curva patrón de Cr VI usada para la determinación en el medio hidropónico.	43
Fig. 5. Cromatogramas obtenidos de HPLC de los estándares internos.....	46
Fig. 6. Sensibilidad de la fase gametofítica a $K_2Cr_2O_7$	48
Fig. 7. Gametofitos expuestos a diferentes concentraciones de $K_2Cr_2O_7$	49
Fig. 8. Sensibilidad de la fase esporofítica a $K_2Cr_2O_7$	51
Fig. 9. Esporofitos expuestos a $K_2Cr_2O_7$ por 168 h.	52
Fig. 10. Contenido de Cr en la fase gametofítica y en el medio de cultivo	56
Fig. 11. Contenido de Cr en el medio de cultivo en la fase gametofítica	58
Fig. 12. Contenido de Cr en la fase esporofítica	63
Fig. 13. Contenido de Cr en la fase esporofítica	65
Fig. 14. Contenido de Cr en el cultivo de la fase esporofítica.....	68
Fig. 15. Contenido de Cisteína, Glutatión y fitoquelatina en la fase gametofítica	72
Fig. 16. Cromatogramas de las partes subterráneas del esporofito, con especial énfasis en el compuesto con un tiempo de retención de 4.5 min	76
Fig. 17. Contenido de Cisteína, Glutatión y fitoquelatina en la fase esporofítica.	77

4 Resumen

La polución de suelos y cuerpos de agua por cromo hexavalente (Cr VI) es un grave problema a nivel mundial. La toxicidad de este metal se debe a su alta solubilidad en agua, formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO), además de propiedades mutagénicas y carcinogénicas. La fitorremediación es una tecnología prometedora para la remoción de metales tóxicos de suelos contaminados, entre ellos el Cr. La vegetación que crece en sitios contaminados ha desarrollado mecanismos de tolerancia a los ambientes inadecuados. Por esta razón, son una fuente de recursos para la aplicación exitosa de la fitorremediación. Uno de los grupos biológicos más resistentes a la presencia de metales tóxicos son los helechos. En los últimos años los helechos se han utilizado experimentalmente para determinar su tolerancia y acumulación a metales como Cr, Pb y As, principalmente en la fase gametofítica de su ciclo de vida, la cual ha dado excelentes resultados y se propone como modelo de estudio ya que esta fase es sencilla de propagar, tiene un crecimiento rápido, talla pequeña (unos cuantos milímetros), se puede mantener en cultivo *in vitro* y tiene la mismas propiedades de resistencia y acumulación que la fase esporofítica. *Pteridium aquilinum* es un helecho hiperacumulador de Cr, de crecimiento rápido, con raíces profundas, tolerante a altas concentraciones de metales y que no es consumida por herbívoros. La especie es fácil de manipular y propagar, por ello se usó como modelo para entender los mecanismos de resistencia y acumulación de Cr con excelentes resultados.

El objetivo de este trabajo fue determinar la respuesta de la vía de síntesis de cisteína glutatión y fitoquelatinas en la resistencia y acumulación de Cr en la fase gametofítica y esporofítica de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn.

Gametofitos de 30 días de edad en condiciones hidropónicas se les sometió a diferentes tratamientos de $K_2Cr_2O_7$ (0, 50, 200, 600 y 800 μM) y se cosecharon a las 24, 48, 72 y 168 h para determinar: clorofila, biomasa (peso seco y peso

fresco); acumulación de Cr; contenido de cisteína, glutatión, γ -glutamil cisteína y fitoquelatinas. Además en la solución hidropónica se midió cromatos y dicromatos, y Cr total en los mismos intervalos de tiempo que la cosecha de los gametofitos, con y sin planta.

Esporofitos de 4 meses de edad en condiciones hidropónicas se sometieron a diferentes tratamientos de $K_2Cr_2O_7$ (0, 800, 1600, 6400 μM) y se cosecharon en los mismos intervalos de tiempo que la fase gametofítica y se midió los mismos parámetros que en la fase gametofítica.

Ambas fases del ciclo de vida de *P. quillinum* son poco sensibles a la presencia de $K_2Cr_2O_7$, ya que la biomasa y la clorofila *a* y *b*, se mantuvieron constante en todas los tratamientos probados. Lo cual corrobora el potencial de la especie para ser aplicado procesos de fitorremediación.

La fase gametofítica es hiperacumuladora de Cr, 915 mg/Kg peso seco (48 h, 800 μM $K_2Cr_2O_7$), tiene un factor de bioacumulación máximo de 56.2 ± 58.5 (168h, 50 μM $K_2Cr_2O_7$), remueve entre el 50 y 30 % de Cr del medio de cultivo (168h), tiene una velocidad de remoción máxima de 13.5 ± 0.7 mg Cr /l de medio/día (24 h, 800 μM $K_2Cr_2O_7$). Lo cual la hace un excelente candidata para ser aplicada en procesos de remediación cuando la concentración de Cr en baja. El GSH tiene aumento en la presencia de Cr a las 24 y 48 horas y es dependiente de la dosis y se tiene el requerimiento necesario de este monotiol para quelar el Cr en cualquier estado de oxidación en que se encuentre dentro de la célula y cumplir las funciones metabólicas normales.

La fase esporofítica también es hiperacumuladora, acumula en las partes subterráneas un máximo de 11 850 mg Cr / Kg peso seco, (168 h, 6400 μM $K_2Cr_2O_7$), tiene un porcentaje de traslocación máximo de 40 ± 26.69 % (48h, 6 400 μM $K_2Cr_2O_7$), el factor de bioacumulación máximo fue en la planta entera de 4.7 ± 1.9 (72h, 800 μM $K_2Cr_2O_7$), su factor de bioacumulación en partes subterráneas fue de 13.1 ± 0.4 (72h 800 μM $K_2Cr_2O_7$) y la mejor velocidad de

remoción es 1189.9 ± 73.7 mg Cr /Kg/día (168 h, 6 400 μ M $K_2Cr_2O_7$). Debido a estas cualidades esta fase de *P. aquilinum* la hacen una excelente candidata para fitoestabilizar el Cr en campo o usarse en procesos de rizofiltración.

El GSH aumenta en presencia de Cr únicamente en el tratamiento de 800 μ M, en el resto de los tratamientos debido a las altas cantidades de Cr dentro de la célula el GSH se puede estar degradando más rápido de lo que se sintetiza y por lo tanto no se puede medir.

A pesar de tener una diferencia estructural y tisular tan diferente, ambas fases parecen tener mecanismos en común y respuestas en común en presencia de Cr para resistirlo y acumularlo, el GSH. Por otro lado, la fase gametofítica representó una ventaja experimental ya que la mayoría de los estudios fueron estandarizados en esta fase por su fácil manejo y su rápido crecimiento a comparación de la fase esporofítica.

En este trabajo por cuestiones de tiempo y estrategia metodológica no se realizaron bioensayos con Plomo, sin embargo sí se realizarán en lo futuro.

5 Abstract

Pollution of soils and water bodies for hexavalent chromium (Cr VI) is a worldwide problem. The toxicity of this metal is due to its high solubility in water, formation of free radicals and reactive oxygen species (ROS) as well as mutagenic and carcinogenic agent. Phytoremediation is a promising technology for removing toxic metals from contaminated soils, including Cr. Vegetation growing on contaminated sites have developed tolerance mechanisms. For this reason, they are a resource for the successful application of phytoremediation. One of the most resistant to biological groups the presence of toxic metals are ferns. In recent years, ferns have been used experimentally to determine their tolerance and accumulation of metals such as Cr, Pb and As, mainly in the gametophytic phase of its life cycle, which has given excellent results and proposes a model to study. The gametophytic phase is easy to spread, rapid growth, small size (a few millimeters), can be maintained in culture *in vitro* and has the same accumulation properties of sporophytic phase. The fern *Pteridium aquilinum* is hyperaccumulator of Cr, tolerant to high concentrations of metals, fast growing, deep rooted and it is not consumed by herbivores. The species is easy to handle and spread, so it was used as a model for understanding the mechanisms of resistance and accumulation of Cr with excellent results.

The aim of this study was to determine the response of the biosynthesis of cysteine and glutathione and phytochelatins in the resistance of Cr accumulation in gametophytic and sporophytic phase of *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn.

Gametophytes 30 days of age in hydroponic conditions were subjected to different treatments $K_2Cr_2O_7$ (0, 50, 200, 600 and 800 μM) and harvested after 24, 48, 72 and 168 h to determine: chlorophyll biomass (fresh weight and dry weight); accumulation of Cr; content of cysteine, glutathione, γ -glutamyl cysteine and phytochelatins. Also in the hydroponic solution was measured chromates and

dichromates, and total Cr in the same interval of time the harvest of the gametophytes, with and without plant.

Sporophytes of 4 months in hydroponic conditions were submitted to different treatments $K_2Cr_2O_7$ (0, 800, 1600, 6400 μM) and harvested at the same intervals of time the gametophyte phase and measured the same parameters as in gametophytic phase.

Both phases of the life cycle of *P. quilinum* are not sensitive to the presence of $K_2Cr_2O_7$ as biomass and chlorophyll a and b were kept constant in all treatments tested. Which corroborates the potential of the specie to be applied for phytoremediation process.

The gametophyte phase is hyperaccumulator of Cr, 915 mg / kg PS (48 h, 800 μM $K_2Cr_2O_7$), has a maximum bioaccumulation factor of 56.2 ± 58.5 (168 hrs, 50 μM $K_2Cr_2O_7$), removes between 50 and 30% Cr from the culture medium (168 hrs), has a high removal rate of 13.5 ± 0.7 mg Cr / l of medium / day (24 h, 800 μM $K_2Cr_2O_7$). These are making it an excellent candidate for application in remediation processes when the concentration of Cr in low. GSH increased in the presence of Cr at 24 and 48 hours and it is dependent on the dose and have the necessary requirement of this monothiol to chelate Cr in any oxidation state that is within the cell and its normal metabolic functions.

The sporophyte phase is also hyperaccumulator, accumulated in the underground parts 11 850 mg Cr / kg dry weight (168 h, 6400 μM $K_2Cr_2O_7$), has a maximum translocation rate of $40 \pm 26.69\%$ (48h, 6 400 μM $K_2Cr_2O_7$), the maximum bioaccumulation factor in the entire plant was 4.7 ± 1.9 (72h, 800 μM $K_2Cr_2O_7$), its bioaccumulation factor in underground parts was 13.1 ± 0.4 (72 h, 800 μM $K_2Cr_2O_7$) and the best removal rate is 1189.9 ± 73.7 mg Cr / kg / day (168 h, 6 400 μM $K_2Cr_2O_7$). For all these qualities in this phase life cycle of *P. aquilinum* make it an excellent candidate for phytostabilization of Cr in the field or used in rhizofiltration processes.

GSH in the presence of Cr increases only in the treatment of 800 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, in the other treatments due to high quantities of Cr into the cell glutathione can be degraded more rapidly than it is synthesized and therefore can not be measured.

Despite having a structural difference and tissue so different, both phases appear to have mechanisms in common and common responses in the presence of Cr to resist and accumulate, the GSH. On the other hand, the gametophytic phase represent an advantage, all studies were standardized in this phase for easy handling and rapid growth compared to the sporophyte phase.

In this work did not make bioassays with Lead, because of time and troubles with methodological, however we will make them in the future.

6 Introducción

La contaminación de suelos y cuerpos de agua alrededor del mundo es un grave problema, que conforme transcurren los años se agudiza. Un grupo de contaminantes de gran importancia son los metales, ya que estos no se pueden degradar o transformar en compuestos inofensivos. Las principales fuentes de estos contaminantes son la industria y las actividades mineras.

La contaminación por metales en México inició en la época colonial, los principales elementos presentes en los ecosistemas son, el cadmio (Cd), arsénico (As), plomo (Pb) y cromo (Cr). En el caso del Cr, es uno de los metales tóxicos más abundantes en mundo ya que es el séptimo elemento más abundante de la Tierra y el vigésimo primero en las rocas de la corteza terrestre. Los suelos contienen entre 5 y 300 $\mu\text{g Cr/g}$. Es un metal de transición, las formas más estables son Cr III y Cr IV, las cuales difieren en sus propiedades químicas. El Cr III es un micronutriente esencial para los animales, en cambio, el Cr VI es una forma muy tóxica, provoca úlceras, dermatitis alérgica y es un agente altamente mutagénico y cancerígeno (Levina y Lay 2005). La extracción mundial de Cr por actividades antropogénicas es del orden de 10^7 toneladas por año. El impacto de este metal en suelos y cuerpos de aguas marinas y continentales ha sido muy alto (Cervantes *et al.* 2001; Gómez y Callao, 2006).

La fitorremediación es una tecnología muy promisoría para la remoción de metales tóxicos de suelos contaminados, entre ellos el Cr (Sarma, 2001). Esta tecnología se define como el uso de las plantas y los organismos asociados a la rizósfera (bacterias y hongos) para remover, transformar o secuestrar sustancias contaminantes de los ecosistemas (Arthur *et al.*, 2005; Sun, 2008). La vegetación que crece en sitios contaminados ha desarrollado mecanismos de tolerancia a los ambientes inadecuados. Por esta razón, las plantas silvestres que se encuentran en estos sitios pueden ser una fuente muy importante de posibilidades para la

biorremediación. Uno de los grupos biológicos más resistentes a la presencia de contaminantes elementales son los helechos.

Pteridium aquilinum es un helecho hiperacumuladora de Cr, de crecimiento rápido, con alta biomasa, con raíces profundas, tolerante a altas concentraciones de metales y que no es consumida por herbívoros. La especie es fácil de manipular y propagar, por ello se le consideró usarla como modelo para entender los mecanismos de resistencia y acumulación de Cr, dando excelentes resultados (datos no publicados).

Uno de los objetivos más importantes dentro de la fitorremediación es determinar los mecanismos que le permiten a las plantas sobrevivir a altas concentraciones de metales, entre ellos Cr. Cuya meta será hallar marcadores bioquímicos que le permitan discriminar las especies prometedoras autóctonas de un sitio contaminado que puedan tener éxito en los procesos de remediación. Los mecanismos que se cree que puedan estar implicados en la resistencia y acumulación en el caso Cr son: Aminoácidos (cisteína y prolina), polipéptidos de bajo peso molecular no proteicos con grupos sulfidrilos (Glutación, Fitoquelatinas), ácidos orgánicos (malato y citrato), las metalotioneínas tipo II y flavonoides, un grupo metabolitos secundarios con actividad antioxidante en las plantas que en los últimos años ha tomado gran importancia (García-García *et al.*, 2009; Hayat *et al.*, 2011; Fernández *et al.*, 2012; Vakili *et al.*, 2012).. Con él fin de apoyar a este campo de investigación emergente se propone este proyecto enfocándose primordialmente en la respuesta de cisteína y polipéptidos de bajo peso molecular no proteicos con grupos sulfidrilo en la especie expuesta a Cr.

En este trabajo también planteó realizar bioensayos con plomo, pero debido a cuestiones de tiempo y problemas que surgieron durante la elaboración de este proyecto no se pudieron realizar, sin embargo se planea hacer en lo futuro.

7 Marco teórico

7.1 Contaminación Ambiental

La contaminación se define como el exceso de materia o energía en un sistema, de cualquier tipo que éste sea, y que evita el funcionamiento del mismo.

La contaminación ambiental, dependiendo de sus propiedades, se puede dividir en tres tipos: física, química y biológica. La contaminación física involucra energía como calor, luz o ruido, además de partículas sólidas como polvo o humo. La contaminación química involucra principalmente elementos o compuestos que reaccionan en el medio donde se encuentran, tanto con factores bióticos como abióticos, un ejemplo son los metales. La contaminación biológica involucra el o los organismos que se encuentran en un ecosistema en exceso o por encima de los niveles poblacionales que el ecosistema puede mantener, por ejemplo las poblaciones humanas. Existen diferentes fuentes de contaminación para su estudio se han dividido en dos: las naturales y las antropogénicas. Las fuentes naturales de contaminación abarcan generalmente eventos catastróficos como lo son, maremotos, erupciones volcánicas, incendios forestales, entre otros, los cuales aportan a los ecosistemas exceso de materia o energía que en algunos casos hace desaparecer por completo al sistema, sin embargo estos eventos suelen ser puntuales. En el caso de la contaminación antropogénica, ésta ha provocado severos problemas ambientales, ya que los eventos no son puntuales e implican por largos periodos de exposición en los ecosistemas. Este tipo de contaminación se ha acrecentado en las últimas décadas, debido al aumento desmesurado de las poblaciones humanas, la necesidad de más recursos naturales y una mayor producción de residuos que se vierten en los suelos, cuerpos de agua y atmosfera. El manejo de residuos, tanto domésticos como industriales ha sido un reto para los gobiernos de todo el mundo. Aunque algunas naciones han tomado medidas importantes para el manejo de los residuos, han descartado la posibilidad que la materia se reincorpore a los ecosistemas y ciclos biogeoquímicos. Generalmente los desechos se confinan y esto nunca será una

solución, solo una forma de postergar el problema (Arthur *et al.*, 2005; Martínez, 2009).

7.2 Contaminación por metales

La contaminación química es uno de los problemas más graves de la actualidad y abarca tanto compuestos orgánicos como inorgánicos (metales pesados, radionucleótidos, nitratos, fosfatos y ácidos inorgánicos) (Arthur *et al.*, 2005) La contaminación por metales es un grave problema, ya que a diferencia de otros contaminantes son sustancias elementales y no se pueden degradar o transformar en sustancias menos tóxicas. Las principales fuentes de contaminación por metales son la industria y las actividades mineras, por dar algunos ejemplo de la gravedad de la contaminación por metales en el mundo, al año se extraen 22 000 toneladas de cadmio (Cd), 939 000 de cobre (Cu), 783 000 de plomo (Pb), 1 350 000 de zinc (Zn) (Sarma, 2011).

Los metales son de vital importancia para los organismos ya que son necesarios para muchas reacciones bioquímicas de óxido-reducción, son parte estructural de proteínas ya sea como coenzimas o cofactores. De los 90 metales existentes en la tabla periódica, alrededor de 17 son necesarios para la vida ya que los organismos los emplean como macronutrientes o micronutrientes como el hierro (Fe), molibdeno (Mo), Zn, Níquel (Ni), Cu, Vanadio (V) y Cobalto (Co), entre otros (Schützendübel y Polle, 2002).

Los metales no esenciales, como el Cd, Pb, Plata (Ag) y Cromo (Cr), por mencionar algunos, son extremadamente tóxicos a concentraciones micromolares, mientras los metales esenciales cuando se encuentran en altas concentraciones, significan un grave problema para los seres vivos. La toxicidad de ambos grupos de metales se debe a que pueden ser competidores de otros elementos, provocar aberraciones en grupos tios de proteínas, promover la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), producir efectos tanto mutagénicos como cancerígenos, entre otros (Seoáñez, 1999; Vatamaniuk *et al.*, 2002)

7.3 Cr

El Cr es el séptimo elemento más abundante en la tierra y vigésimo primer elemento más abundante en la corteza terrestre. La concentración de este metal en los suelos alrededor del mundo oscila entre 10 y 50 mg/ kg, mientras que su concentración en cuerpos de agua es de 0.1 y 117 $\mu\text{g}/\text{l}$ y en la atmósfera se encuentra de 5-13 pg/m^3 . La extracción mundial de este metal es de 100 000 000 de toneladas al año de las cuales alrededor del 70% se usa para la manufactura de acero inoxidable, ya que es un inhibidor en la corrosión de metales, el restante se emplea para la producción de plaguicidas, colorantes y curtido de pieles (Merts, 1969; Hayat *et al.*, 2011).

El Cr es un metal de transición de la familia VI B, se pueden encontrar en un estado de oxidación de 2- a 6+, las especies más comunes en el ambiente son trivalentes (Cr III) y hexavalentes (Cr VI). La forma trivalente es el estado menos tóxico y más abundante en la naturaleza, es poco soluble en agua y se le ha atribuido características de micronutrientes en plantas y animales, ya que en las plantas expuestas a bajas concentraciones de este metal aumentan su desarrollo, mientras en animales parece estar involucrado con la absorción de glucosa en sangre relacionando su actividad con la regulación de insulina (Vaiopoulou y Gikas, 2012). El Cr VI es la forma más tóxica de este metal, ya que el Cr se encuentra unido a oxígenos formando cromatos (CrO_4^{2-}) o dicromatos ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), el Cr en este estado de oxidación dentro de un sistema biológico es un agente altamente oxidante ya que en los sistemas biológicos por reacciones químicas espontáneas es reducido a Cr III y durante este proceso reacciona con facilidad con enlaces insaturados de los fosfolípidos del sistema de membranas de la célula o con los enlaces disulfuro y grupos carboxilos de las proteínas, entre otras interacciones (Kotas y Stasicka, 2000).

La toxicidad del Cr VI es un hecho ampliamente conocido. La exposición prolongada a sales de este metal tanto en humanos como en animales, produce diversos efectos dañinos a la salud, en la piel produce desde pequeñas irritaciones

hasta severas dermatitis, en vías respiratorias puede provocar, irritación en las vías respiratorias, asma o neumonía. Quizás una de los efectos más severos de las sales de Cr VI es su genotoxicidad que desencadena en la ruptura del ADN lo que provoca una gran cantidad de enfermedades sistémicas, entre las más severas esta la causa de diversos tipos de cáncer, como de faringe, estomago, hígado y riñón. Esto se debe a que el Cr VI dentro de la célula forma por un lado dicromatos de potasio, sodio o amonio o cromatos de calcio o estroncio y estos compuestos afectan directamente al ADN, provocando mutaciones y aberraciones cromosómicas, o bien durante la reducción de Cr VI a Cr III se forman intermediarios como el Cr V y IV que tienen un alta reactividad con el ADN y proteínas y forman complejos proteína-Cr-ADN el cual es muy estable y no se disocia durante la replicación y desencadena en la ruptura del ADN (Dayan y Paine, 2001; Vaiopoulou y Gikas, 2012).

7.4 Contaminación por Cr

A pesar de que se tiene bien documentada la toxicidad del Cr en los seres vivos, la contaminación por este metal es un grave problema tanto en suelos como en cuerpos de agua. Alrededor del mundo en poblaciones humanas ha habido casos de intoxicación severa por este metal, los países más recurrentes son la India y Japón. La contaminación por Cr en México es poca en comparación con otros metales como el Pb y el Arsénico (As), pero hay dos casos de gran relevancia: uno de ellos fue la empresa Cromatos de México, clausurada en 1978, que debido a que tene en su cementerio de desechos tóxicos alrededor de 75 000 toneladas de Cr, ubica a la empresa como uno de los cinco lugares con mayor contaminación química en el país (La Jornada, 2002; La Crónica, 2008). Se han intentado hacer procesos de remediación, como remoción física del suelo, sin embargo debido a los costos tan elevados de esta tecnología no ha logrado descontaminar lo que fue la empresa Cromatos de México; el otro caso es la presa La Silva en León Guanajuato, debido a que una curtidora de pieles vertió sus desechos en un afluente del embalse de la presa provocó la muerte de cientos de aves migratorias.

7.5 Remediación

La remediación se define como los procesos, químicos, físicos o biológicos que se utilizan en un sitio contaminado, ya sea suelo, aire o cuerpos de agua, para la destrucción, modificación, extracción, separación, aislamiento o inmovilización de uno o varios contaminantes. Estos procesos pueden realizarse en el mismo lugar donde se encuentra el sistema contaminado, *in situ*, o bien retirar el sistema junto con su contaminante para llevarlo a reactores donde se remedia, *ex situ*. Las técnicas que se pueden emplear son diversas en el caso de procesos físico-químicos está la remediación electrocinética, lavado de suelos con surfactantes, extracción de vapores, solidificación, estabilización, tratamiento químico (reacciones de óxido reducción), separación física, desorción térmica, incineración, vitrificación, pirolisis, entre otras (Volke y Velasco, 2002), sin embargo estos procesos son extremadamente caros cuando se enfrentan contra grandes extensiones de tierra o agua, sin contar la heterogeneidad de condiciones cuando se aplican *in situ*. Una alternativa muy factible e interesante para la absorción, acumulación o transformación de estos contaminantes elementales es la biorremediación (Yu *et al.*, 2008).

7.6 Biorremediación

La biorremediación se define como la aplicación de los organismos y sus rutas metabólicas para la limpieza de suelo, agua y aire contaminados (Raskin y Ensley, 2000). La ventaja que presenta sobre otras técnicas de remediación es que es de bajo costo, elimina la mayor parte de los contaminantes sin inutilizar el ecosistema de manera irreparable, y quizás una de sus más grandes ventajas es que socialmente es aceptada (Tabla 1.). Dentro de esta disciplina se engloban varias técnicas como lo son bioventeno, bioestimulación, bioaumentación y biolabranza, por destacar algunos (Volke y Velasco, 2002).

Tabla 1. Costo de los tratamientos de remediación de suelos contaminados por metales.

Tratamiento	Costo (Dólares/Tonelada de suelo)
Vitrificación	75-425
Remoción física del suelo	100-500
Tratamientos químicos	100-500
Electrocinesis	20-200
fitoextracción	05-10

Fuente: Sarma, 2011.

7.7 Fitorremediación

Durante varios años hubo una separación entre la fitorremediación y la biorremediación, ya que la biorremediación solo abarcaba los microorganismos y sus rutas metabólicas, sin embargo en los últimos años se engloban esta tecnología en ella. La fitorremediación se define como el uso de las plantas y los organismos asociados a la rizósfera (bacterias y hongos) para remover, transformar o/y secuestrar sustancias contaminantes de los ecosistemas (Sun, 2008; Monferrán, 2012). La fitorremediación se aplicó para la remediación de suelos y cuerpos de agua contaminados por compuestos orgánicos y metales tóxicos, pero en los últimos años varios microorganismos han demostrado ser más eficientes para la remediación de compuestos orgánicos y no para contaminantes elementales, por lo tanto la fitorremediación se ha enfocado en la remoción de contaminantes elementales, principalmente metales y metaloides tóxicos, ya que las plantas son acumuladoras por excelencia de metales tanto esenciales como no esenciales, y en algunas especies acumulan grandes cantidades de estos metales dentro de sus tejidos sin mostrar daño visible (aportación personal).

Las plantas que se aplican en los procesos de fitorremediación deben cumplir con ciertas características para un protocolo exitoso de remediación, estas características son (USEPA, 2000; Clemens *et al.*, 2002):

- Crecimiento rápido.
- Gran biomasa en campo.
- Un sistema de raíces profundo.
- Ser tolerantes a altas concentraciones del metal o metales de interés
- Que pueden ser cosechadas con relativa facilidad
- Además se espera que sean hiperacumuladora del metal o metales de interés, aunque esta cualidad no es indispensable.

En la literatura existen varias propuestas para determinar si una planta es considerada hiperacumuladora. La primera y más aceptada, indica que la acumulación del metal dentro de los tejidos de las plantas debe superar cierto porcentaje en la biomasa (peso seco). Para el caso de Zn y Mn es del 1.0%; para Aluminio (Al), Arsénico (As), Selenio (Se), Ni, Co, Cr, Cu y Pb es 0.1%; y para Cd 0.01% (Jeffré *et al.*, 1976; Morel *et al.*, 2002; Branquinho *et al.*, 2007). El criterio que consideran Reeves y Baker (2000) es que la planta debe contener en sus hojas (peso seco) más de 1000 mg/kg peso seco para el caso del Cr. Una tercera, indica que el contenido del metal en las partes aéreas debe ser 10 a 500 veces mayor que el contenido en condiciones normales (Shen y Liu, 1998; Haque *et al.*, 2007). Y una cuarta postula que el contenido del metal en los tejidos de la planta debe ser indudablemente mayor en las partes aéreas con respecto a las partes subterráneas (Baker y Walker, 1989; Baker *et al.*, 1994; Haque *et al.*, 2007).

La fitorremediación involucra tres procesos, la fitovolatilización, la fitoestabilización y la fitoextracción. La fitovolatilización, es la absorción de elementos del sustrato a los tejidos, y por medio de reacciones de reducción se volatiliza a través de las hojas, por ejemplo, el mercurio (Hg). La fitoestabilización es el uso de plantas en

un área determinada para evitar la erosión y transporte del o los contaminantes a otros sitios, además en algunas casos las plantas secretan sustancias que inmovilizan a estos contaminantes reduciendo sus solubilidad y por lo tanto su biodisponibilidad. La fitoextracción, es uno de los procesos más socorridos en la fitorremediación, porque además de fitoestabilizar los contaminantes en un área, es posible extraerlos, solamente cosechando la planta (Krämer, 2005).

Debido al constante aumento de contaminantes elementales en el medio ambiente, la fitorremediación se ha convertido en una alternativa muy prometedora para resolver este problema. En los últimos años se han realizado diversos estudios de fitorremediación con varios metales y metaloides tóxicos, entre ellos destacan Zn, Mn, Al, As, Ni, Cr, Cu, Pb, y Cd. En la actualidad en el mundo hay alrededor de 500 especies citadas como hiperacumuladoras, distribuidas en 101 familias de plantas, (Asteraceae, Brassicaceae, Caropyllaceae, Cunoniaceae, Fabaceae, Flacourtiaceae, Laminaceae, Poaceae, Violaceae, Euphorbiaceae, entre otras) que representan el 0.2% de la diversidad de las angiospermas, aunque podría haber hasta 750 especies vegetales con potencial para ser aplicados en procesos de fitorremediación (Sarma, 2011).

7.8 Fitorremediación de Cromo.

Como se ha mencionado el Cr en el ambiente es un grave problema de salud tanto pública como ecosistémica, y la fitorremediación resulta ser una atractiva alternativa para el tratamiento de sitios contaminados con este metal. Hasta mayo del 2012, en una búsqueda exhaustiva en las principales bases de datos como PubMed, ScienceDirect e Ilumina se tiene citadas alrededor de 60 especies de plantas acumuladoras o hiperacumuladoras de Cr en condiciones de laboratorio. El género *Brassica* es el modelo de planta más citado para la remoción de este metal en suelos contaminados, mientras que en plantas acuáticas destaca el género de helechos acuáticos *Azolla* debido a su porcentaje de acumulación. De las 60 especies, solo *Oryza sativa*, *Brachiaria mutica*, *Eichhornia crassipes* son aplicadas en un proceso cuaternario en el tratamiento de aguas residuales en

China e India para la remoción de Cr (Chandra y Kulshreshtha, 2004; Mohanty *et al.*, 2011). La planta terrestre hiperacumuladora por excelencia de Cr es *Convolvulus arvensis* L. que acumula 20 000 ppm peso seco en raíz y es la número uno de las cinco especies que encabeza la lista para aplicarlas en procesos de remediación, debido a que cumple con todos los requisitos necesarios para la aplicación en procesos de fitorremediación, también en esta lista destacan especies de los géneros *Brassica*, *Datura* y *Pteridium*, debido tanto a sus propiedades de acumulación de este metal, propiedades ecológicas y propiedades metabólicas (Gardea-Torresdey *et al.*, 2004).

7.9 Toxicidad de Cr en las plantas

Las plantas expuestas a altas concentraciones de Cr presentan diversos signos de toxicidad, los más comunes son: 1) Reducción en el porcentaje de germinación, esto se debe quizás a que el Cr inhibe amilasas lo que lleva a un pobre aporte de nutrimentos al embrión; 2) hay una disminución en las raíces y pelos radicales, el Cr parece tener un efecto inhibitorio en la división celular y la elongación de las paredes celulares; 3) reducción de la talla de las partes aéreas y reducción foliar y número de hojas, en este caso se atribuye a un déficit de minerales, ya que el Cr parece ser competidor de elementos, como el fósforo (P) y azufre (S), además de sustituir metales esenciales como Mo y Mg en las metaloenzimas; 5) Interferencia en la fotosíntesis, ya que la presencia de este metal inhibe el transporte de electrones, enzimas del ciclo de Calvin y reduce la fijación de CO₂, debido a la desorganización del cloroplasto por la oxidación de fosfolípidos ocasionado por la reducción del metal; 6) descontrol de las relaciones hídricas de la planta, ya que se ve afectado el potencial hídrico, la tasa de evapotranspiración, y reducción del diámetro de los elementos del xilema; 7) disminución en la absorción de elementos como el Nitrógeno (N), P, Potasio (K), Fe, Magnesio (Mg), Mn, Mo, Zn, Cu, Calcio (Ca) y Boro (B); 8) en algunos casos en las plantas expuesta a Cr se ha presentado la disminución de cisteína, glutatión e inhibición de la síntesis de fitoquelatinas porque es competidor de S(Shanker *et al.*, 2005).

Por ello las plantas resistentes e hiperacumuladoras de Cr deben tener ciertos mecanismos que les permitan sobrevivir ante altas concentraciones de este metal y absorberlo.

7.10 Mecanismos de resistencia y acumulación de Cr en las plantas

Uno de los objetivos más importantes dentro de la fitorremediación es determinar los mecanismos que le permiten a las plantas sobrevivir a altas concentraciones de metales, ya que no se sabe el significado biológico de la hiperacumulación de metales tóxicos. Sin embargo los mecanismos de resistencia y acumulación en plantas a metales tóxicos, entre ellos el Cr, a nivel bioquímico y genético son poco entendidos. El Cr VI en medio ambiente está en forma de ion CrO_4^{2-} o $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, entra a la célula por medio de los acarreadores de sulfatos, ya que el Cr VI en esta forma tiene un arreglo tetraédrico con los átomos de oxígeno y dos cargas negativas muy similar al sulfato, o bien por la unión a sideróforos como ácidos orgánicos que facilitarían su entrada a la célula, aunque este segundo tipo de transporte para el Cr VI no ha sido demostrado en plantas. En especies muy resistentes a Cr VI, porque han sido inducidas por medio de mutaciones o seleccionadas de manera natural en los sitios contaminados, presentan una reducción en el número de acarreadores de sulfatos y en la capacidad de acumulación del metal, por esta razón el número de acarreadores de sulfato se asocia con la resistencia a este metal y no como un mecanismo de acumulación per se; una vez dentro de la célula el Cr VI es reducido a Cr III, el cual es más inocuo, sin embargo durante este proceso se forman especies como el Cr V, el cual induce daños en el ADN y forma radicales libres como el $\text{OH}\cdot$ a partir de H_2O_2 . Una vez reducido Cr III se compartamentaliza, ya sea en vacuolas, en cloroplasto, en mitocondria o retículo endoplasmico después de ser quelado por un amplia variedad de proteínas, polipéptidos y aminoácidos todavía no determinadas con exactitud (Raskin *et al.*, 1994; Sarma, 2011; Shanker *et al.*, 2005; García-García *et al.*, 2009; Vaiopoulou y Gikas, 2012).

7.10.1 Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos como el ácido ascórbico, ácido málico, ácido oxálico y ácido nicotínico son agentes quelantes que usa la planta para solubilizar a metales como el Cu, Zn y Mn, cuando estos se encuentran en concentraciones muy bajas en el suelo, el grupo carboxilo de estos compuestos se une al metal y el complejo es transportado al interior de la célula a través de acarreadores específicos (Fig. 1). Estas moléculas, experimentalmente, se incrementan en el cultivo en presencia de Cr VI, esto se puede deber a dos razones: la primera es que los ácidos orgánicos son excretados en los exudados de las raíces lo cual reduce el pH en el suelo y provoca que el Cr VI sea más y pueda entrar a la célula a través de los acarreadores específicos; la segunda señala que los ácidos orgánicos son excretados una vez que el Cr VI es reducido a Cr III con el cual se unen y lo interiorizan de manera más rápida a pesar de estar en un estado de oxidación menos biodisponible, por ejemplo en *Helliantus* sp. cuando se le agrega ácido ascórbico en el medio aumenta la tasa de absorción de Cr. Los ácidos orgánicos no solamente son excretados por las raíces en respuesta al estrés provocado por los metales, por ejemplo, el ácido málico intracelular aumenta en presencia de metales tóxicos. A pesar de que en plantas expuestas a Cr no se ha observado este tipo de respuesta, no se debe descartar la posibilidad que estas moléculas se encuentren relacionados en los mecanismos de resistencia y acumulación a Cr en las plantas (Raskin *et al.*, 1994)

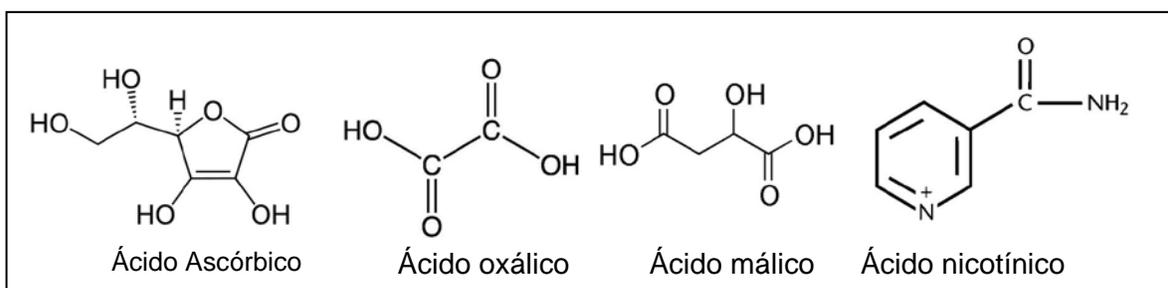


Fig. 1. Ácidos orgánicos involucrados en la resistencia y acumulación de metales tóxicos en plantas.

7.10.2 Aminoácidos

Se ha comprobado que algunos aminoácidos como la prolina aumenta en plantas expuestas a Cr, particularmente en *Atropa belladonna*. Este aminoácido contribuye a la estabilidad de organelos y sistemas de membranas celulares ya que está involucrado en la limpieza de radicales libres, además de que sirve como buffer celular del potencial redox en condiciones de estrés (Vakili *et al.*, 2012).

7.10.3 Proteínas

Las metalotioneínas (MTs) son polipéptidos constituidos por 60-80 aminoácidos y contienen de 9-16 residuos de cisteínas ubicadas en dos dominios, hay dos tipos de MTs, las tipo I (Mt1) con dos dominios tándem ricos en cisteínas (Cys-X-Cys-X-Cys-X-Cys-X-) y metalotioneínas las tipo II (Mt2) que son proteínas con dos dominios tándem ricos en cisteínas (Cys-X-X-Cys-X-X-Cys-X-X-Cys-X-X-), donde X puede ser cualquier aminoácido. Las MTs pueden proteger a las plantas de los efectos tóxicos de los iones metálicos, ya que el metal se une a los grupos tioles de las cisteínas de la proteína. Se especula que una vez que las MTs se unen al metal, este complejo es transportado a las vacuolas y se mantiene ahí por un largo tiempo, lo que confiere a la planta resistencia y acumulación (Panda y Choudhury, 2005; Quaggiotti *et al.*, 2007).

Una vez que el Cr VI es reducido a Cr III dentro de la célula por interacción con la materia orgánica, las MTs podrían estar involucradas en la resistencia y acumulación de Cr en plantas, debido que absorben, transportan y compartimentalizan metales esenciales para el metabolismo; además la expresión de las MTs aumenta en las plantas expuestas a este metal (Eapen y D'Souza, 2005).

7.10.4 Biomoléculas con grupos sulfidrilos

Uno de los mecanismos propuestos para la resistencia y acumulación en plantas a diversos metales tóxicos, involucra moléculas ricas en azufre, en forma de grupos sulfidrilo (SH). La mayor parte del azufre tomado por las plantas del suelo es absorbido en forma de sulfato (SO_4^{2-}) e incorporado al aminoácido cisteína en los

tejidos fotosintéticos. La absorción del sulfato por las raíces es, en su mayor parte, un proceso metabólico mediado por proteínas acarreadoras las cuales son sujetas a un control negativo por medio del monitoreo de la concentración intracelular del SO_4^{2-} y de los productos del metabolismo del S (Fig. 2) (Anderson, 1981; Rennenberg *et al.*, 1982; Benavides, 1998).

La importancia de la asimilación del azufre en las plantas y en otros organismos es que aproximadamente el 40% de las enzimas dependen para su actividad catalítica de la presencia de grupos SH que forman enlaces disulfuro dentro de las proteínas. Dichos grupos SH proporciona sitios de unión para metales tóxicos o fisiológicamente importantes, se relacionan con la detoxificación de diversos xenobióticos y se ven involucrados en numerosas reacciones redox debido a su relativa facilidad de oxidación (Benavides, 1998).

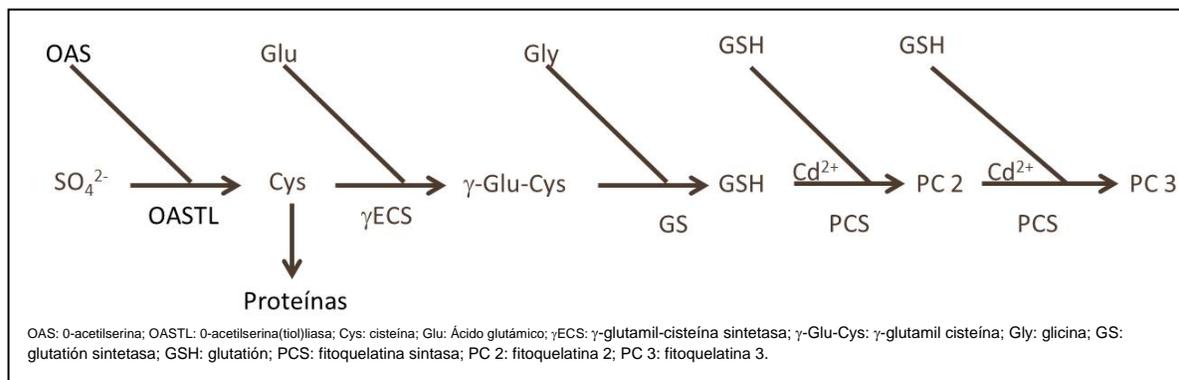


Fig. 2. Ruta de asimilación del azufre en plantas.

7.10.4.1 Cisteína

La cisteína (Cys) es un aminoácido azufrado que junto con la metionina es un factor clave para determinar el valor nutricional en las plantas, así como molécula central en el metabolismo de asimilación del S en todos los organismos vivos (Benavides, 1998). La cisteína es el paso final en la vía de asimilación de SO_4^{2-} y es catalizada por 0-acetilserina (tiol) liasa (OASTL), esta enzima incorpora el grupo sulfuro a la 0-acetilserina (OAS), este último producto de la acetilación de la

serina por la acción de la serina-acetiltransferasa (SAT) (Domínguez-Solís *et al.*, 2004).

La cisteína está involucrada en la acumulación de Cr en *Euglena gracilis*, ya que en presencia de este metal aumenta, aunado que en *E. gracilis* el Cr se acumula en el cloroplasto, lugar dentro de la célula donde los niveles de cisteína son más altos (García-García *et al.*, 2009). Para el caso de plantas el trabajo de Domínguez-Solís *et al.*, (2004) señala que el incremento de la tasa de biosíntesis de la cisteína es responsable de la acumulación y tolerancia de metales como el Cd en tricomas de *Arabidopsis thaliana* aunque no se tiene nada citado en el caso de Cr.

La importancia de la cisteína en la resistencia y acumulación a metales tóxico entre ellos el Cr, es debido a que junto con la glicina y el ácido glutámico es un aminoácido necesario para la síntesis del glutatión (GSH), tripéptido de bajo peso molecular no proteico con un grupo SH, el cual juega un papel muy importante en respuesta al estrés en plantas. Además el aminoácido cisteína es la molécula limitante en la reacción de síntesis de GSH, ya que este aminoácido no se recicla como el ácido glutámico y la glicina. El GSH está implicado en la respuesta en plantas a altas concentraciones de metales tóxicos, así como también es precursor de las fitoquelatinas, péptidos ricos en grupos tioles implicados en la detoxificación del Cd, Zn, Cu y otros metales.

7.10.4.2 Glutatión

El glutatión (GSH) es un compuesto de bajo peso molecular, con un grupo SH más importante en plantas. El GSH como se mencionó es un tripéptido formado por cisteína, ácido glutámico y glicina. La síntesis del glutatión se lleva a cabo en dos etapas. La primera consiste en la formación de la γ -glutamil cisteína catalizada por la enzima γ -glutamil-cisteína sintetasa que une al ácido glutámico y a la cisteína, siendo la presencia y ausencia de la cisteína el punto de regulación en la formación del producto. El segundo paso es la adición de la glicina a la γ -glutamil-cisteína catalizado por la glutatión sintetasa, este paso es el segundo punto de

regulación en la formación de GSH, ya que el producto ejerce una aza de retroalimentación negativa inhibiendo la actividad de la glutatión sintetasa (Martínez *et al.*, 2006).

El GSH está relacionado en el almacenaje y transporte de sulfuros, la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, así como un modulador en la actividad de varias enzimas. Los niveles de glutatión en las plantas también ha sido asociado con su adaptación a temperaturas extremas, a la tolerancia a xenobióticos y factores estresantes en su entorno, ya sean bióticos o abióticos. Debido a la relación del GSH y a condiciones de estrés para la planta se pueden dilucidar importantes mecanismos de homeostasis dentro de las células vegetales. Por ejemplo es su relación con metales tóxicos se ha observado un aumento en su concentración conforme aumentan las concentraciones de metal en cuestión, algunos autores señalan que los metales al producir estrés oxidativo activan la vía de síntesis de esta molécula ya que es un potente agente reductor, pero otros señalan que no solo puede tener este papel sino también el de interactuar directamente quelando a los metales (May *et al.*, 1998).

7.10.4.3 Homoglutatión

Se pensaba que el glutatión era el compuesto de bajo peso molecular con grupos sulfhidrilos presente en mayor cantidad en todas las plantas, sin embargo en estudios realizados en algunas especies de leguminosas y otras familias de angiospermas han encontrado una molécula denominada homoglutatión (hGSH). Esta molécula, al igual que el glutatión, es un poderoso reductor, la diferencia del hGSH con respecto al GSH es que en vez de presentar un residuo de glicina, presenta uno de alanina (Klapheck, 1988).

7.10.4.4 Fitoquelatinas

Las fitoquelatinas (PCs), cadistinas o metalotioneínas tipo III, son polipéptidos derivados de la polimerización de moléculas de glutatión. La fórmula condensada de las fitoquelatinas es $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, donde n es igual a 2-15, dependiendo de la n hay fitoquelatina 2, fitoquelatina 3 hasta fitoquelatina 15. La síntesis de

fitoquelatinas es llevada a cabo por la γ -glutamylcisteinadipetiltranspeptidasa comúnmente llamada fitoquelatina sintasa. Se considera que la fitoquelatina sintasa es constitutiva porque se encuentra relacionada en la homeostasis de Cu y Zn. En algunas plantas la exposición de 3 a 500 μ M de Cd provoca la aparición e incremento de (γ -Glu-Cys) 2-Gly, seguido por una larga oligomerización de varios péptidos γ -Glu-Cys. Se ha citado que metales divalentes como el Mg, Zn, Cu y Cd son activadores de la fitoquelatina sintetasa ya que la enzima tiene un sitio de unión a ellos. Un hecho comprobado ya que en presencia de estos metales las plantas producen más fitoquelatinas y de un mayor peso molecular. Se ha visto en un muchas especies vegetales que la concentración intracelular de estos polipéptidos aumenta en presencia de los metales como Ni, Cu, Zn, Ag, Sn, Sb, Te, W, Au, Hg, Pb, mientras que metales Na, Mg, Al, Ca, V, Cs, Mn, Fe, Co, Mo y Cr parecen no tener ese efecto. A pesar que las fitoquelatinas son inducidas por los metales pesados, tiene como limitante la disponibilidad de GSH y por otro lado, un excesivo aumento de la fitoquelatinas en la plantas conduce a la pérdida total de GSH lo que se traduce en un aumento de estrés oxidativo en la célula, lo que a su vez puede desencadenar en la muerte celular (Rouser, 1995; Álvarez-Legorreta *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2012; Vakili *et al.*, 2012).

7.10.4.5 Homofitoquelatinas

Las homofitoquelatinas (hPCs) son derivados de la polimerización del homoglutación en vez de glutación, son péptidos que presentan la siguiente fórmula (γ -Glu-Cys) $_n$ - β -Ala (Rouser 1995; Vakili *et al.*, 2012). De las homofitoquelatinas no hay reportes en la literatura de su actividad en la homeostasis de metales, además que no hay reportes de plantas acumuladoras de metales pesados que las presenten, aunque se pueden confundirse con las fitoquelatinas, ya que ambos tipos grupos de moléculas tiene propiedades químicas parecidas.

7.11 Estado actual del estudio de los mecanismos de resistencia y acumulación a Cr en plantas.

La búsqueda de los mecanismos de acumulación y resistencia a Cr en las plantas, ha sido un camino lento, ya que a diferencia de otros modelos biológicos, las plantas tienen un menor crecimiento y las condiciones experimentales presentan un mayor número de variables, ya que no se pueden mantener en cultivos *in vitro* debido a la talla que alcanzan cuando madura. Una alternativa ha sido la implementación de cultivos hidropónicos para mantener bajo control un mayor número de variables posibles. Otra forma ha sido implementar cultivos celulares, protoplastos, sin embargo esta estrategia ha demostrado ser infructuosa ya que la respuesta celular a metales pesados no representa la respuesta a nivel orgánico. Como se mencionó, para entender los mecanismos a este fenómeno se han usado especies de los géneros *Datura* y *Brassica*. Sin embargo en los últimos años se ha visto que los helechos debido a su ciclo de vida representan un modelo experimental más factible (Memon *et al.*, 2001; Clemens *et al.*, 2002; Hall, 2002; Meharg, 2005; Zabloudowska *et al.*, 2009; Schiavon *et al.*, 2012) .

7.12 Helechos

Este grupo de plantas que en años recientes ha tomado gran importancia para explicar cuáles son los mecanismos de resistencia y acumulación de Cr, Pb y As (Kamachi *et al.*, 2005).

Los helechos son un grupo de plantas que se caracterizan por presentar un ciclo de vida con alternancia de generaciones, con una fase gametofítica (n) que es muy reducida, esta fase es laminada pluriestratificada y monoestratificadas en ciertas regiones, de células fotosintéticas. En esta etapa del ciclo de vida se forman los gametos (oosfera y anterozoides) por medio de divisiones mitóticas, cuando las condiciones son propicias en su entorno se lleva a cabo la fecundación, lo que forma un cigoto (2n). Con la formación del cigoto se inicia la fase esporofítica, el cigoto permanece dependiente de la fase gametofítica por un corto periodo de tiempo, sufre divisiones mitóticas y forma el embrión, conforme el

embrión se desarrolla la fase gametofítica que lo contiene y alimenta, muere. La fase esporofítica, una vez madura, está presentada por las raíces, tallos y hojas, y es la etapa dominante en el ciclo de vida de estas plantas. Durante esta etapa por medio de divisiones meióticas se forman las esporas, que germinan y dan origen a la fase gametofítica para reiniciar el ciclo (Raven *et al.*, 2005)

En años recientes la fase gametofítica de los helechos ha sido tomada como modelos para estudiar varios fenómenos, ya que esta fase en estudios experimentales ha demostrado ser fácil de manejar y de controlar las variables en su entorno debido a su tamaño reducido y su crecimiento rápido, en comparación de la fase esporofítica. Además la fase gametofítica ha demostrado tener la misma respuesta a nivel celular, bioquímico y fisiológico que la fase esporofítica a un mismo estímulo, por ejemplo, hormonas, herbicidas, pH, temperatura, intensidad luminosa, entre otras condiciones. En el caso particular de metales tóxicos, se ha observado que cuando la fase esporofítica es poco sensible e hiperacumuladora a un metal en particular, la fase gametofítica presenta estas mismas cualidades. Este mismo comportamiento se ha observado cuando la fase esporofítica es sensible y no acumula un metal determinado, la fase gametofítica de la especie también es sensible y no acumula el metal dentro de sus tejidos. *Pteris vittata* en su fase esporofítica es hiperacumuladora de As, en ensayos realizados en la fase gametofítica indican un mismo porcentaje de acumulación de metaloide dentro de sus tejidos que la fase diploide de la especie. Otro caso es *Athyrium yokoscense*, la fase esporofítica es hiperacumuladora de Pb y la fase gametofítica demostró tener la misma cualidad (Evans y Bozzone, 1977; Evans y Conway, 1980; Tittle, 1987; Banks, 1999; Keary *et al.*, 2000; Kamachi *et al.*, 2005; Pickering *et al.*, 2006).

Los helechos acumuladores de Cr, se resumen a muy pocas especies, en sistemas acuáticos son miembros del género *Azolla* y en sistemas terrestres tenemos a dos especies, *Pteris vittata* y *Pteridium aquilinum* (Su *et al.*, 2005; Arora *et al.*, 2006).

7.13 *Pteridium aquilinum*

Pteridium aquilinum (L.) Kuhn es una especie hiperacumuladora de Cr y se ubica entre las primeras cinco especies con mayor potencial para la remediación de suelos contaminados con este metal, ya que además de ser una especie acumuladora posee características fitoquímicas y ecológicas importantes. *P. aquilinum* posee amplias capacidades ecológicas: propagación subterránea, gran producción de esporas, alta resistencia al fuego y a la sequía. Estas características le permiten colonizar lugares inhóspitos y áreas perturbadas; actuar como planta pionera en claros de bosques, selvas, pastizales; e invadir zonas de cultivo. Por esta razón en algunos países (Gran Bretaña, India) se le considera como una maleza y se han usado herbicidas como el “Asulam” para su erradicación con muy poco éxito (Tinklin y Bowling, 1969; Gliessman, 1978; Navar *et al.*, 1987; Dolling 1999; Keaky *et al.*, 2000; Riege y Del Moral 2004; Watrud *et al.*, 2003; Eslava, 2009).

P. aquilinum es un helecho que pertenece a la Familia Dennstaedtiaceae, conocido como helecho potrero, es una planta que presenta un ciclo de vida con alternancia de generaciones heteromórficas (Fig. 3). La fase esporofítica es terrestre, posee un rizoma largamente rastrero, peloso y subterráneo; hojas de un tamaño de 0.5 a 1 m; peciolos ocasionalmente con yemas epipetiolares cerca de la base; lamina hasta cuatro veces pinada, pelosa o glabra, sin yemas en las axilas de las pinas distales; pinas ocasionalmente con nectarios oscurecidos en sus axilas; nervaduras libres bifurcadas; soros marginales, continuos excepto en los senos, dispuestos a lo largo de una nervadura comisural que une los ápices de las nervaduras; indusio doble, el adaxial formado por el margen recurvado, el abaxial inconspicuo, hialino aparentemente no siempre presente; esporas triletas (Morán y Riba, 1995; Mickel y Smith, 2004).

P. aquilinum presenta características que la perfilan como un modelo excelente para el estudio de los mecanismos involucrados en la resistencia y acumulación Cr, ya que es un especie hiperacumuladora de este metal, de fácil propagación y

con gran capacidad de aplicarse en procesos de fitorremediación con éxito (Eslava 2009).

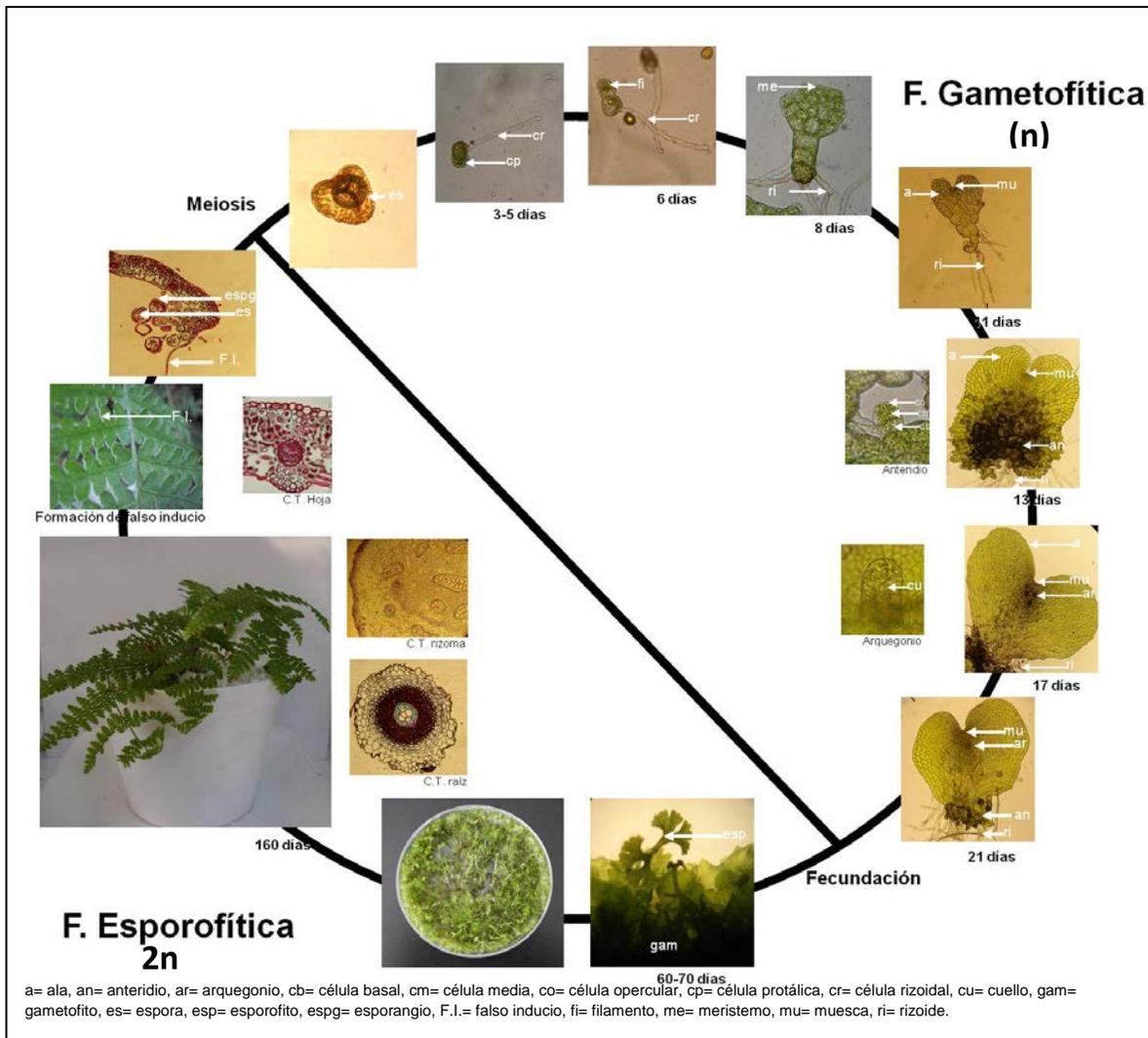


Fig. 3. Ciclo de vida de *P. aquilinum*

8 Hipótesis

La fase gametofítica y la fase esporofítica de *P. aquilinum* aumentará el contenido intracelular de aminoácidos y polipéptidos de bajo peso molecular no proteicos con grupos sulfidrilos como lo son cisteína, glutatión y fitoquelatinas en presencia de Cr VI y habrá una relación entre el Cr acumulado por la planta y el contenido de estos compuestos en ambas fases del ciclo de vida de este helecho.

9 Objetivo General.

- Determinar la respuesta de la vía de síntesis de cisteína (Cys), glutatión (GSH) y fitoquelatinas (PCs) en la resistencia y acumulación de Cr en la fase gametofítica y esporofítica de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn

10 Objetivos particulares

- Determinar la capacidad de hiperacumulación de Cr en ambas fases del ciclo de vida de este helecho.
- Determinar la sensibilidad de la especie a Cr en ambas fases de su ciclo de vida.
- Evaluar en la fase gametofítica y esporofítica la respuesta de la cisteína, glutatión y fitoquelatinas en presencia de Cr.

11 Método

11.1 Estrategia desarrollada

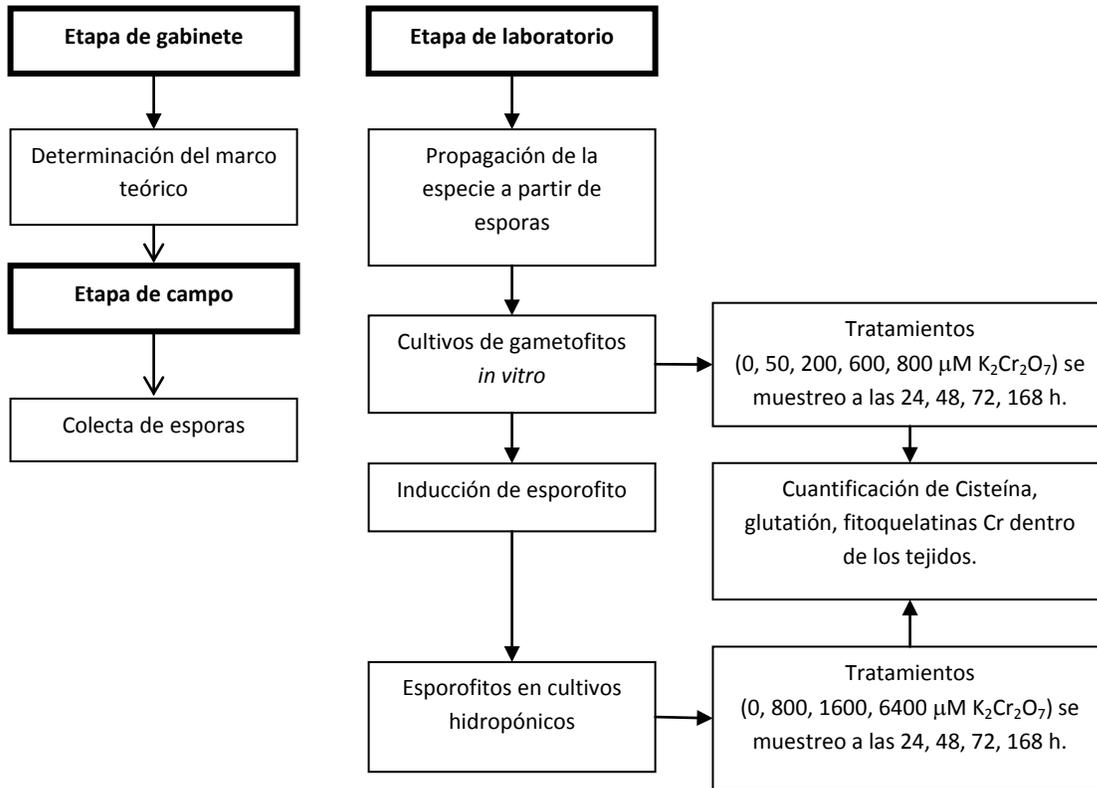
El estudio se dividió en tres etapas.

De gabinete: en esta etapa se determinó el estado de arte, la especie y los compuestos quelantes a determinar.

De campo: En esta etapa se colectaron esporas de *P. aquilinum* para su posterior propagación.

De laboratorio: se realiza la propagación de la especie a partir de esporas, se establece cultivos de gametofitos *in vitro* y esporofitos en hidroponia. Se determina la concentración de diferentes compuestos con grupos sulfhidrilo (Cisteína, Glutación, fitoquelatinas) en la fase gametofítica y esporofítica del helecho en diferentes concentraciones de Cr VI y tiempos de exposición al metal, por medio de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High performance liquid chromatography). Se midió con espectrofotometría de absorción atómica por el método de la flama la acumulación de Cr dentro de los tejidos de ambas fases del ciclo de vida del helecho.

Cuadro 1. Estrategia a desarrollar para la determinación de los quelantes involucrados en los procesos de resistencia en el gametofito y esporofito de *P. aquilinum*.



11.2 Material biológico.

Se recolectaron esporas de *P. aquilinum*, en mayo de 2009, en la localidad “La Cantera” (latitud 20°39’54.3”N, longitud 98°39’56.2” W y altitud 2036 mnsn.) ubicada en el Municipio de Zacualtipán, Estado de Hidalgo. Las esporas se desecaron y tamizaron de acuerdo con el procedimiento de Muñiz *et al.* (2008) y se mantuvieron a 4 °C.

11.3 Propagación de *Pteridium aquilinum*.

Para la propagación de *P. aquilinum* se siguió el método elaborado por Eslava (2009).

11.3.1 Medios de cultivo.

En los experimentos realizados *in vitro* se empleó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962) modificado con la mitad de la concentración de todos sus componentes: ½ MS (ver anexo 1). Se ajustó el pH del medio de cultivo a 5.7 usando HCl y KOH 1N y se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 120° C.

11.3.2 Desinfección y siembra de esporas de *Pteridium aquilinum*.

Se colocaron 90 mg de esporas en un microtubo de centrifuga y se agregó 1.5 mL de la solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.3% (v/v). El tubo permaneció en agitación 2 minutos. Las esporas se centrifugaron un minuto a 14 000 rpm. El sobrenadante con las esporas suspendidas, se pasó por un papel filtro, las esporas se enjuagaron tres veces con 5 mL de agua destilada y se resuspendieron en 10 mL de agua destilada. Se inocularon 250 µL de la suspensión de esporas de *P. aquilinum* en cajas de Petri de 66x15 MM con 5 mL de medio ½ MS. Todo lo anterior en condiciones de esterilidad.

11.3.3 Cultivo de gametofitos.

Las esporas sembradas en ½ MS se mantuvieron a 25°C con un fotoperiodo largo, 16 h luz/8 h oscuridad. 17 días después de la siembra de las esporas, los gametofitos maduros (con estructuras reproductoras) se trasplantaron a frascos con 25 ml de medio nuevo ½ MS.

11.3.4 Cultivo de esporofitos.

Los gametofitos maduros y trasplantados a medio ½ MS nuevo, se les regó dos veces por semana con 1mL de agua destilada estéril, hasta la aparición de los esporofitos, los cuales se desarrollaron 60 días posteriores a la siembra de las

esporas. Los esporofitos de 10 días de edad se trasplantaron a frascos con medio de cultivo nuevo ½ MS y se mantuvieron en condiciones *in vitro* durante 40 días.

Esporofitos con 50 días de edad fueron trasplantados a recipientes de medio litro de capacidad con 180 g de agrolita humedecida con solución hidropónica (ver anexo 2). Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero, entre 18 y 25°C, bajo iluminación natural con dos riegos por semana con solución hidropónica. Su aclimatización se realizó por reducción gradual de humedad en condiciones de invernadero durante un mes.

11.4 Tratamientos con K₂Cr₂O₇ a los que fueron expuestos la fase gametofítica y esporofítica de Pteridium aquilinum.

Fase gametofítica. 1 g de gametofitos de 30 días de edad fueron trasplantados a cajas Petri 66X15 mm con 3 ml de solución hidropónica estéril con diferentes concentraciones de K₂Cr₂O₇: 0, 50, 200, 600 y 800 µM. Los gametofitos se cosecharon a las 24, 48, 72 y 168 horas después de haber sido trasplantados en las diferentes concentraciones de Cr. Los gametofitos cosechados se les determinaron los siguientes parámetros: biomasa (peso fresco y peso seco), contenido de clorofila a y b, bioacumulación de Cr total, y contenido de Cys, GSH y PCs. Se realizaron tres replicas independientes para cada uno de los parámetros cuantificados.

Además se realizaron los mismos tratamientos con K₂Cr₂O₇ pero sin la presencia de gametofitos. Después de la cosecha de las plantas se colectó la solución hidropónica de las cajas Petri con planta y sin planta, y determinó contenido de Cr VI y Cr total.

Fase esporofítica. Esporofitos de 4 meses de edad en condiciones hidropónicas se les agregó 100 ml de solución hidropónica suplementada con diferentes concentraciones de K₂Cr₂O₇: 0, 800, 1600 y 6400 µM. Las plantas estuvieron expuestas a 24, 48, 72 y 168 horas a los tratamientos hasta su cosecha. Las plantas se dividieron en: partes aéreas (hojas y peciolas) y partes subterráneas

(raíces y rizoma). En ambas partes se midieron los siguientes parámetros: Biomasa (peso seco) y bioacumulación de Cr total. En las partes aéreas se midió contenido de clorofila a y b, y en las partes subterráneas se determinó contenido de Cys, GSH y PCs. Se realizaron tres replicas independientes para cada parámetro evaluado.

Además se realizaron los mismos tratamientos de $K_2Cr_2O_7$ pero sin la presencia de esporofitos. Después de la cosecha de las plantas se tomó la solución hidropónica con esporofitos y sin esporofitos para cuantificar Cr VI y Cr total en los sustratos.

11.5 Sensibilidad de la fase gametofítica y esporofítica de *Pteridium aquilinum* a Cr.

11.5.1 Biomasa.

Tantos los gametofitos y esporofitos, expuestos a las diferentes concentraciones de $K_2Cr_2O_7$ en los diferentes intervalos de tiempo, se colocaron en el horno Cole Parmer (Modelo 05015-54) a 60 °C por 3 días, hasta que su peso fue constante.

11.5.2 Contenido de clorofila a y b.

En los gametofitos y las partes aéreas de la fase esporofítica, expuestos a las diferentes tratamientos $K_2Cr_2O_7$, se determinó la concentración de clorofila a y b de acuerdo con el método de Yu *et al.* (2008).

Después de la cosecha se tomaron 0.5 g peso fresco de tejido, se cortó en trozos pequeños, se colocó dentro de matraces volumétricos de 25 ml y se aforaron con acetona al 80%. Se mantuvieron en agitación constante por 24 h y en oscuridad constante. Para la medición de clorofila a y b se utilizó un espectrofotómetro marca ThermoSPECTROINIC, HELIOF. La longitud de onda que se utilizó para medir la clorofila a y b fue de 645 y 663 nm, respectivamente. Se tomó como blanco para ambas longitudes de onda acetona al 80%.

El contenido de clorofila a y b en los tejidos de las plantas fue calculada por la siguientes fórmulas (Maclachalam y Zalík 1963):

$$C_a = \frac{(12.3 D_{663} - 0.86 D_{645}) V}{(d)(1000) (P)}$$

$$C_b = \frac{(19.3 D_{645} - 3.6 D_{663}) V}{(d)(1000) (P)}$$

Donde C_a es la concentración de clorofila *a* (mg/g PF), C_b la concentración de clorofila *b* (mg/g PF), D es la densidad óptica de la onda indicada, V es el volumen final (ml), P es el peso del tejido (g) y d es la distancia que recorre la luz, de su fuente a la muestra (1cm).

11.6 Contenido de Cr en ambas fases del ciclo de vida de Pteridium aquilinum.

Las fases gametofítica y esporofítica, expuesta a los diferentes tratamientos, se cosecharon y después se realizaron cuatro lavados, el primero con una solución EGTA (Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) a 1mM pH 7, otro con una solución de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) al 20% (p/v) pH 7, el tercero con una solución de ácido nítrico al 5% (v/v) y el ultimo con agua destilada, todo con la finalidad de remover el Cr adsorbido en las paredes celulares.

La fase gametofítica, así como las partes aéreas y subterráneas de la fase esporofítica se secaron en un horno marca Cole Parmer (Modelo 05015-54) a 60°C por tres días hasta que su peso fue constante, luego se homogenizaron con nitrógeno líquido y se guardaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml a temperatura ambiente hasta su procesamiento para la cuantificación de Cr.

La determinación de Cr en los tejidos de ambas fases se realizó siguiendo el método EPA 3051 (<http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/3051.pdf>).

Se pesaron 0.2 g de cada muestra. Las muestras se colocaron en vasos de teflón y se les agregó 5 ml de ácido nítrico (ULTRAXII JT Baker) y 5 ml de ácido

clorhídrico (marca Riedel de Haën). La digestión se efectuó calentando las muestras en horno de microondas para digestión ácida (Mar X CEM) hasta 190°C por 10 minutos, con 20 minutos de intervalo de temperatura ambiente hasta la temperatura final. El material digerido se filtró con papel filtro (Whatman® N° 42, libre de cenizas). El líquido resultante se vertió en matraces volumétricos y se aforó a 50 ml con una solución de ácido nítrico al 3% (v/v).

Para corroborar que el método de extracción empleado fuera el óptimo (más del 90% de extracción total del metal), se usó como material de referencia hojas de jitomate con una concentración de Cr de 1.9 mg/ kg (Standar Reference Material® 1573a, National Institute of Standards and Technology).

La medición de Cr se realizó en el espectrofotómetro de absorción atómica marca Varian SpectrAAA 880. Para la calibración del espectrofotómetro se hizo una curva de estándar de Cr (TraceCERT®, 1000 mg/l Cr in nitric acid, N° Cat. 02733-250ML), las concentraciones manejadas fueron: 1, 2, 3, 4 y 5 mg/Kg.

11.7 Cuantificación de cromatos y Cr total en los medios de cultivos de la fase gametofítica y esporofítica de Pteridium aquilinum.

11.7.1 Determinación de cromatos en el medio de cultivo.

Se utilizó la reacción colorida de DFC (1,5-Difenilcarbácida) (Taras *et al.*, 1971; García-García, 2008). Se preparó la solución A, DFC 0.2% (p/v) disuelto en etanol al 90%, y la solución B, ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 10% (v/v). Se mezcló la solución A y B en una proporción 1:4 para que se pueda llevar a cabo la reacción colorida.

Para la medición de las muestras se mezcló 0.5 ml de reactivo DFC y 0.5ml de la solución hidropónica diluida en agua, 1:10 para las de la fase gametofítica y 1:100 para la fase esporofítica. Se homogenizó la muestra y se leyó a 520 nm en un espectrofotómetro (ThermoSPECTROINIC, HEλIOF). Se realizó la curva patrón con un Estándar de Cromo para Espectrometría de Absorción Atómica (Fig. 4).

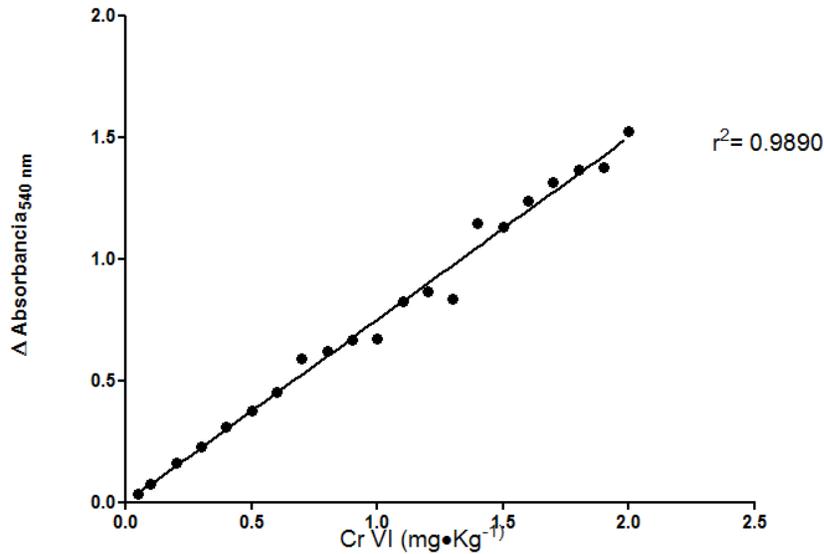


Fig. 4. Curva patrón de Cr VI usada para la determinación en el medio hidropónico.

11.7.2 Cr total en los medio de cultivo.

Se tomó 1 ml de solución hidropónica para los tratamientos de la fase gametofítica y 200 mg de sustrato de los tratamientos de la fase esporofítica (previamente secado en un horno a 60°C por 3 días), se digirieron y cuantificaron de acuerdo al el procedimiento descrito para la cuantificación del metal en los tejidos de la especie.

11.8 Porcentaje de translocación, factor de bioacumulación, velocidad de acumulación y velocidad de remoción de Cr en *Pteridium aquilinum*.

Una vez obtenidos los datos de acumulación de Cr por *P. aquilinum* y el Cr total en sus respectivos medios de cultivo y sustratos se determinó los siguientes parámetros:

Para la fase esporofítica la eficiencia de translocación (Yu *et al.*, 2008).

$$t(\%) = \frac{C_{(p. aéreas)} \cdot PS_{(p. aéreas)}}{C_{(p. subterráneas)} \cdot PS_{(p. subterráneas)} + C_{(p. aéreas)} \cdot PS_{(p. aéreas)}} \times 100$$

Para ambas fases del ciclo de vida fue el Factor de Bioacumulación (BFC, bio-concentration factor), velocidad de bioacumulación (TAR, total accumulation rate) y velocidad de remoción (V) (Yu *et al.*, 2008; Mohanty *et al.*, 2011).

$$\text{BDF} = \frac{C_{\text{(planta entera)}}}{C_{\text{(inicial del sustrato)}}$$

$$\text{TAR} = \frac{C_{\text{(p. aéreas)}} \cdot \text{PS}_{\text{(p. aéreas)}} + C_{\text{(p. subterráneas)}} \cdot \text{PS}_{\text{(p. subterráneas)}}}{(\text{PS}_{\text{(p. aéreas)}} + \text{PS}_{\text{(p. subterráneas)}}) \cdot \Delta t}$$

$$V = \frac{C_{\text{(inicial sustrato)}} - C_{\text{(final sustrato)}}}{\Delta t}$$

Donde C es la concentración de Cr (mg/Kg) absorbido por las diferentes partes de la planta, PS es peso seco (g) y Δt periodo en días.

11.9 Cuantificación de cisteína, glutatión y fitoquelatinas en los tejidos de *Pteridium aquilinum*.

Se tomaron 150 mg de gametofitos y de las partes subterráneas de *P. aquilinum* después de haber sido sometidos a los diferentes a los tratamientos con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, se homogenizó el tejido con nitrógeno líquido y se le colocó en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, se le agregó 980 μl de agua destilada y 20 μl de DTT a 100 mM. Las muestras se mantuvieron a -70°C hasta la medición de tioles.

Para la medición de los compuestos tiolados se descongelaron las muestras a temperatura ambiente, se les adicionó 6.6 μl de Triton X-100 al 15% (v/v) y se incubó por 20 minutos, después se le agregó 100 μl de PCA (ácido perclórico) al 30% (v/v), se incubó por un minuto más, se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 minutos (Centrifuga Eppendorf 5804 R), se tomó el sobrenadante y se pasó por un

filtro con tamaño de poro 0.45 μm (MILLEX-HV 0.45 μm , Filter unit, MILLIPORE), del filtrado obtenido se tomaron 99 μl y se le agregó 1 μl de PCA 30% (v/v).

Se tomaron 20 μl de ésta última mezcla y se inyectaron al HPLC (Waters1525, Binary HPLC Pump) equipado con una columna C-18 Waters Novo –Pak, la cual fue equilibrada con TFA (ácido trifluoroacético) 0.1% (v/v). Las muestras fueron separadas por un gradiente de fase reversa de 1-20% de acetonitrilo al 100% en TFA 0.1%, la separación se realizó por 60 min a un flujo de 1 ml/min.

Los compuestos con grupos sulfidrilo fueron detectados después de haber pasado por una columna mediante una reacción colorida con DTNB (5,5'-Ditiobis(2-Ácido nitrobenzoico)) 0.1 mM en un buffer de KH_2PO_4 al 0.1 M, pH 8 ajustado con KOH. Esta reacción fue medida por un espectrofotómetro (Waters 2489 UV/visible detector) acoplado al HPLC a una absorbancia de 412 nm.

Para identificar y cuantificar los compuestos correspondientes a los picos obtenidos en los cromatogramas se usaron estándares internos de Cys, GSH, γ -EC, PC2 y PC3 (Anaspec Inc., San Jose, CA, USA) (Fig. 5).

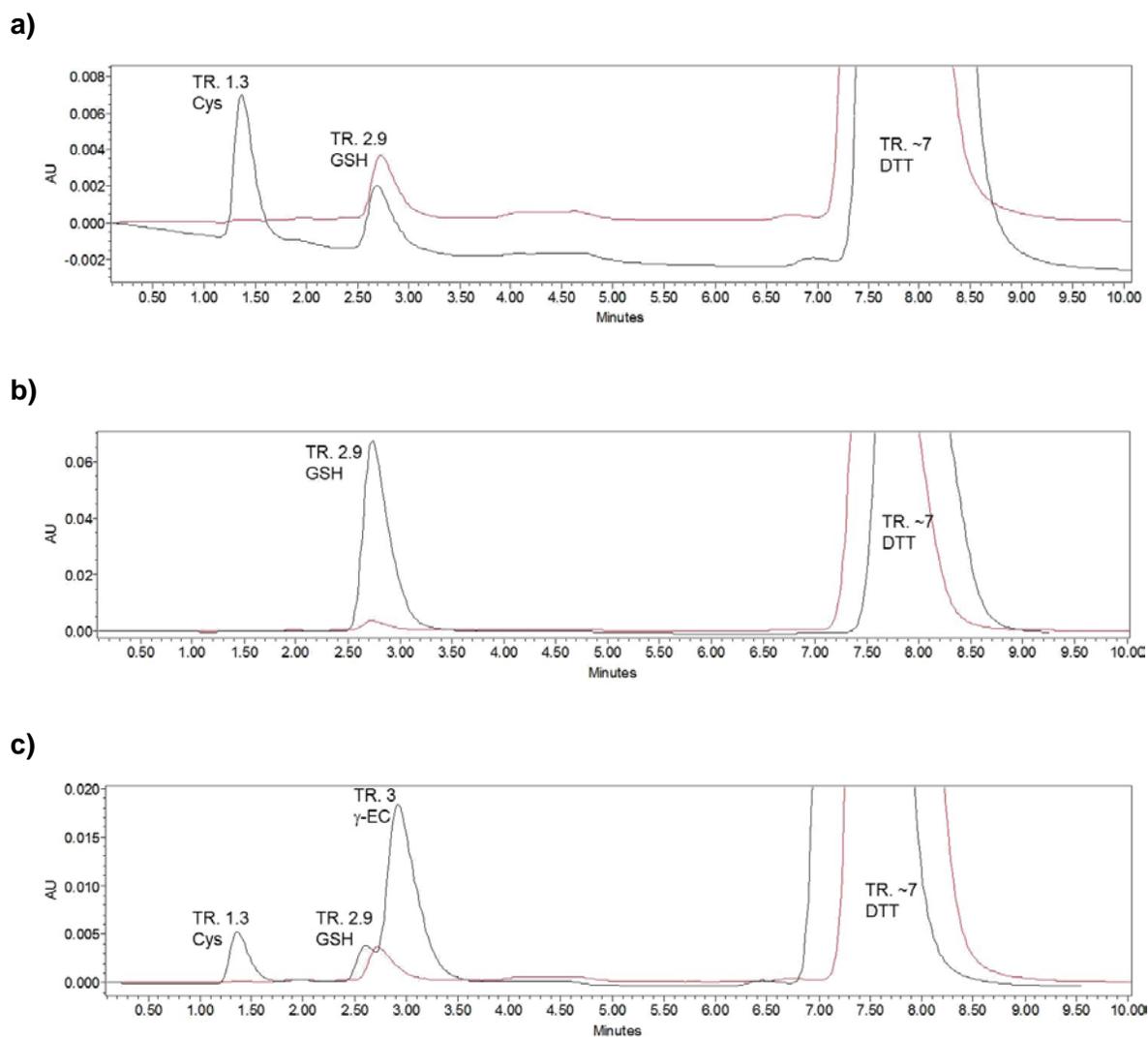


Fig. 5. Cromatogramas obtenidos de HPLC de los estándares internos. a) Cisteína (TR. 1.3 min); b) GSH (TR. 2.9); c) γ -EC (3.0 min).

11.10 Análisis estadístico

Para todos los parámetros evaluados se realizaron tres replicas independientes, se determinó el promedio y la desviación estándar y se aplicó una prueba de varianza (ANOVA) de una vía y la post-prueba que se usó para determinar diferencias significativas entre los tratamientos fue la de Diferencia Mínima Significativa (DMS) con una $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa IBM SPSS Statistics 20®.

12 Resultados y discusión

12.1 Sensibilidad de la fase gametofítica y esporofítica de *Pteridium aquilinum* al Cr.

Ambas fases del ciclo de vida de *P. aquilinum* son poco sensibles a la presencia de $K_2Cr_2O_7$, ya que la biomasa y la clorofila a y b, se mantuvieron constante en todas los tratamientos probados.

La biomasa de la fase gametofítica en peso fue alrededor de 1.137 ± 0.27317 g y en peso seco fue de 0.0520 ± 0.0136 g (Fig. 6a y 6b). El contenido de clorofila a y b en los gametofitos fue de 0.167 ± 0.0378 mg/g peso fresco y 0.084 ± 0.0120 mg/g peso fresco respectivamente (Fig. 6c y 6d). No hubo diferencias significativas en la biomasa y clorofila de las plantas, incluso en las concentraciones más altas de $K_2Cr_2O_7$ (800 μ M). A pesar de lo anterior gametofitos expuestos a 800 μ M de $K_2Cr_2O_7$ durante 168 h se observó que algunos individuos presentaron una clorosis notoria (Fig. 7l), pero su proporción dentro de la población que se muestreó no tuvo repercusiones en el comportamiento, esto indica que tenemos individuos que son sensibles a Cr y otros no, es decir una población heterogénea.

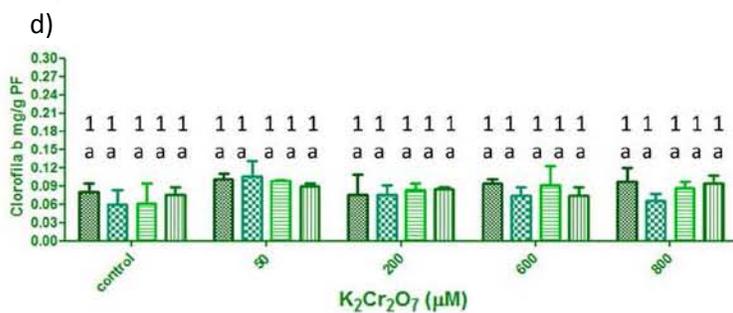
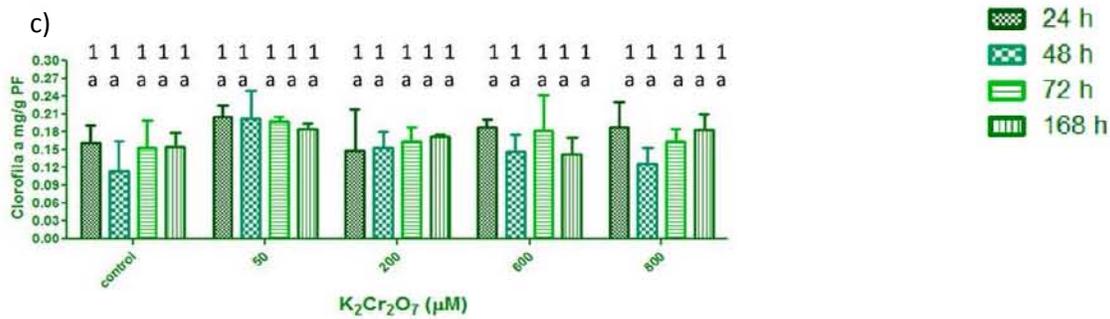
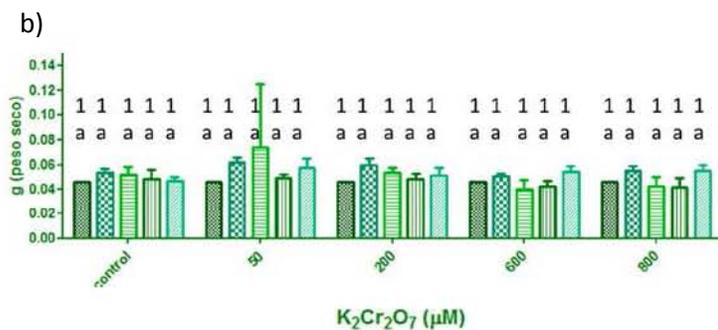
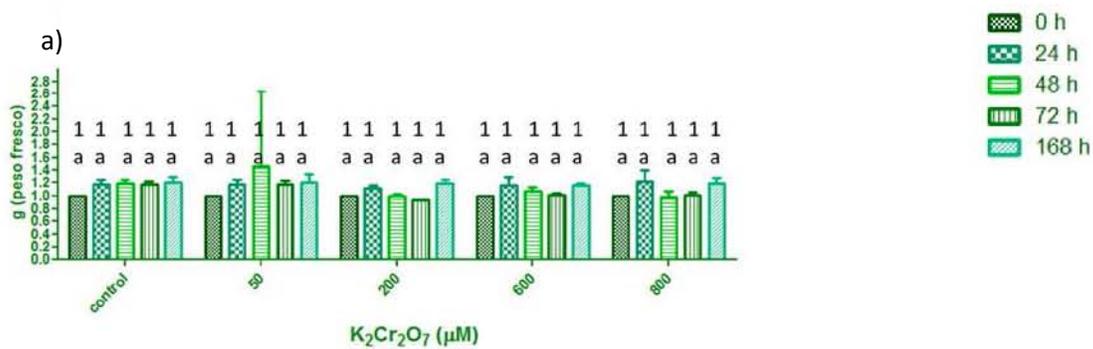


Fig. 6. Sensibilidad de la fase gametofítica a $K_2Cr_2O_7$. a) Biomasa de los gametofitos, peso fresco, b) Biomasa de los gametofitos peso seco, c) contenido de clorofila *a* en los gametofitos, d) contenido de clorofila *b* en gametofitos. Letra diferente indica diferencias significativas en un mismo tratamiento $K_2Cr_2O_7$ en los diferentes intervalos de tiempo y número diferente indica diferencias significativas entre todos los tratamientos de $K_2Cr_2O_7$ en el mismo tiempo de muestreo. (DMS $p < 0.05$, $n=3$).

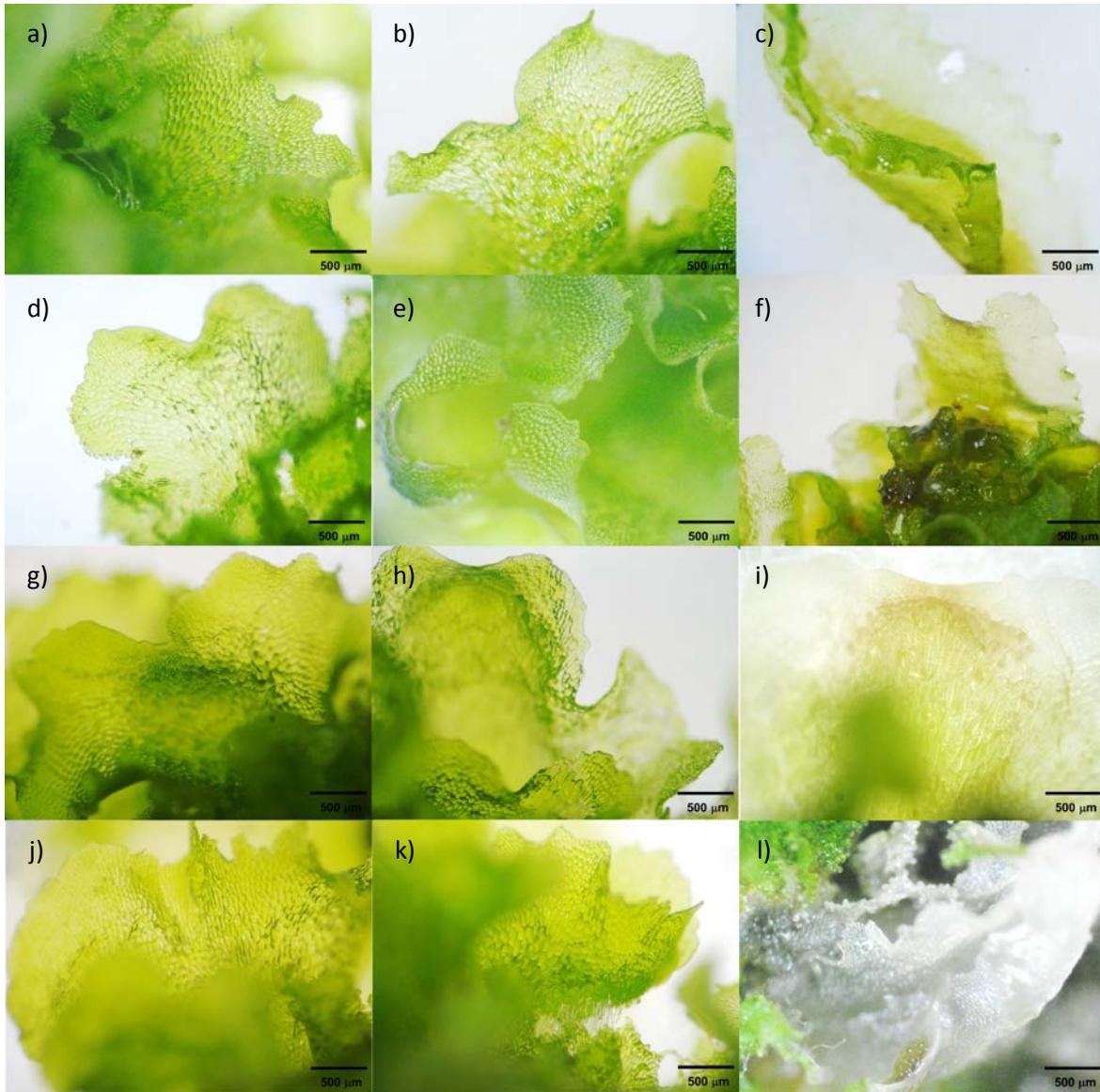


Fig. 7. Gametofitos expuestos a diferentes concentraciones de $K_2Cr_2O_7$. a) 24 h 0 μM $K_2Cr_2O_7$, b) 24 h 600 μM $K_2Cr_2O_7$, c) 24 h 800 μM $K_2Cr_2O_7$, d) 48 h 0 μM $K_2Cr_2O_7$, e) 48 h 600 μM $K_2Cr_2O_7$, f) 48 h 800 μM $K_2Cr_2O_7$, g) 72 h 0 μM $K_2Cr_2O_7$, h) 72 h 600 μM $K_2Cr_2O_7$, i) 72 h 800 μM $K_2Cr_2O_7$, j) 168 h 0 μM $K_2Cr_2O_7$, k) 168 h 600 μM $K_2Cr_2O_7$, l) 168 h 800 μM $K_2Cr_2O_7$. Los tratamientos de 50 y 200 μM $K_2Cr_2O_7$, no se muestran porque no presentaron ningún tipo de daño.

La biomasa en peso seco de la fase esporofítica, sí se vio afectada de una manera positiva en ciertos tratamientos con Cr, a 800 μM de $K_2Cr_2O_7$ a las 24 y 168 h se observó un incremento en las partes aéreas con respecto a su control, este mismo comportamiento se observó a las 168 h en los individuos expuestos a 1 600 y 6 400 $K_2Cr_2O_7$ (Fig. 8a). En las partes subterráneas de los esporofitos bajo tratamiento el Cr no tiene efecto, su peso fue alrededor de 0.140 ± 0.086 g peso

seco. En plantas expuestas a Cr esta región siempre sufre una disminución de biomasa, ya que es por donde se absorbe el Cr y por lo tanto está más expuesta a los daños que ocasiona este metal (Fig. 8b), mientras que la talla de las partes aéreas no se ve afectada.

El contenido de clorofila *a* en las hojas de *P. aquilinum* permanece constante en la mayoría de los tratamientos. Se observó un aumento de ella a las 48 h en los esporofitos que fueron expuestos a la concentración de 6 400 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ con respecto a su control, de 1.22 ± 0.17 a 2.31 ± 1.28 mg/g peso fresco; también las plantas expuestas a 6 400 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ incrementaron sus niveles de clorofila *a* a las 48 h, 2.31 ± 1.28 mg/g peso fresco, y después hubo una abrupta disminución a las 72 h, 0.48 ± 0.06 mg/g peso fresco, restableciendo sus niveles a las 168 h, 0.79 ± 0.07 , en este tratamiento también observó que a las 168 h había marchitamiento de las hojas maduras quizás por el daño que ocasiona el Cr en las relaciones hídricas de la planta. El único decremento de clorofila *a* se observó en los individuos sometidos a 1600 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ a las 72 h de 1.42 ± 0.15 a 0.65 ± 0.22 mg/g peso fresco, para luego regresar a un estado basal de 1.14 ± 0.24 mg/g peso fresco.

La clorofila *b* permaneció estable en todos los tratamiento excepto a las 48 h en los tratamientos de 800 y 6400 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ donde hubo un aumento de clorofila *b*, 0.71 ± 0.19 y 1.11 ± 0.49 mg/g peso fresco respectivamente, que a las 72 h regresa a la normalidad, para 800 μM fue de 0.41 ± 0.07 mg/g y para 6 400 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ de 0.22 ± 0.03 mg/g. A las 72 h en el tratamiento de 1 600 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ disminuye el contenido de clorofila *b* a 0.27 ± 0.10 mg/g, restableciéndose a las 168 h, 0.47 ± 0.11 mg/g peso fresco.

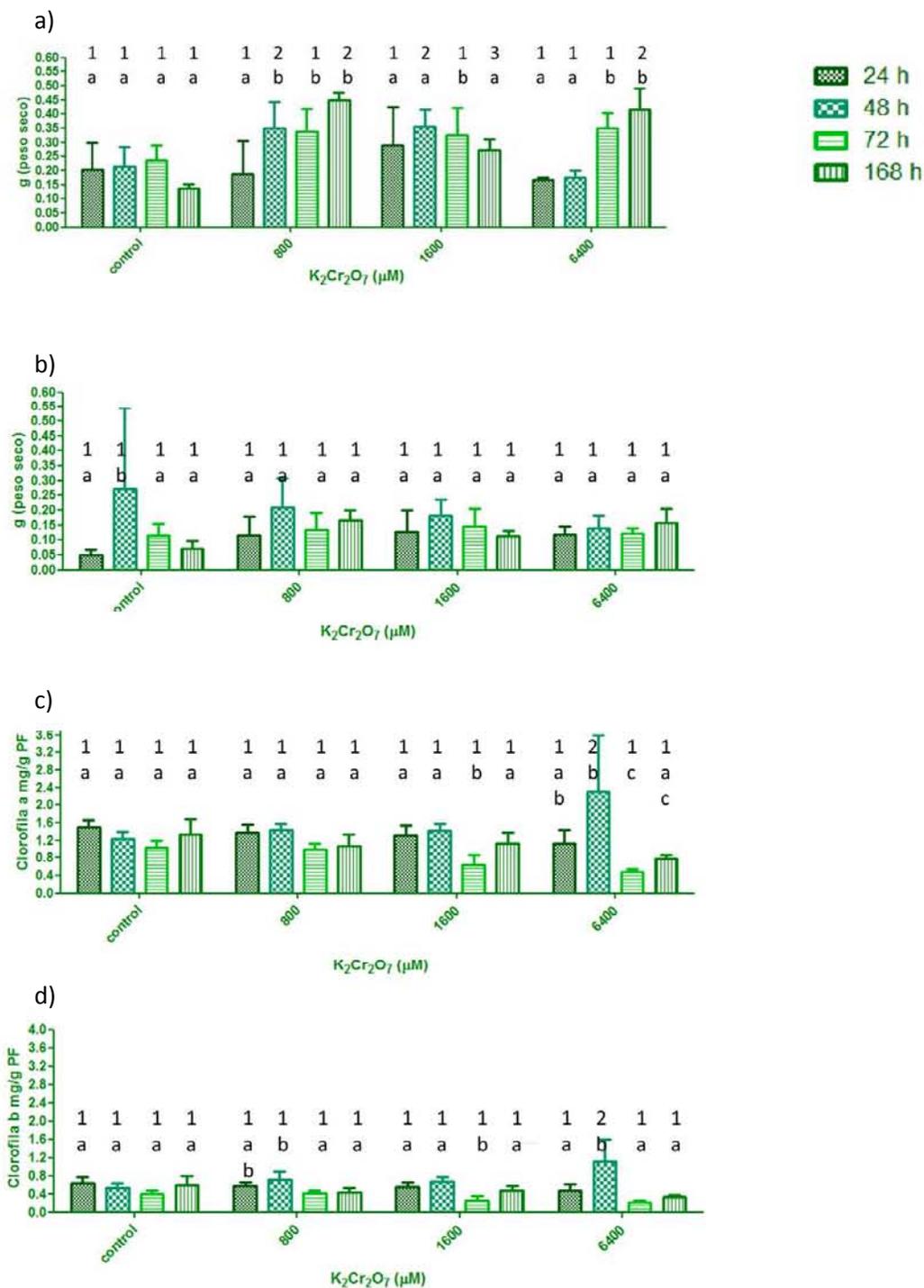


Fig. 8. Sensibilidad de la fase esporofítica a $K_2Cr_2O_7$. a) Biomasa partes aéreas, peso seco, b) Biomasa partes subterráneas, peso seco, c) contenido de clorofila a en las partes aéreas, d) contenido de clorofila b en las partes aéreas. Letra diferente indica diferencias significativas en un mismo tratamiento $K_2Cr_2O_7$ en los diferentes intervalos de tiempo y número diferente indica diferencias significativas entre todos los tratamientos de $K_2Cr_2O_7$ en el mismo tiempo de muestreo. (DMS $p < 0.05$, $n = 3$).



Fig. 9. Esporofitos expuestos a $K_2Cr_2O_7$ por 168 h.

El efecto del Cr VI en la biomasa es resultado muy debatido, aunque hay varios reportes que indican que a bajas concentraciones incrementa el desarrollo de las partes aéreas, otros señalan que aún en bajas concentraciones ($0.1 \mu\text{g/l}$) disminuye la biomasa; esta disminución se puede deber a varias razones, por un lado tenemos el deterioro de las estructuras de absorción, y por el otro un daño en la translocación de nutrimentos a las partes aéreas y daño en organelos como mitocondrias y cloroplastos. Por otro lado algunos autores señalan que el Cr

puede tener un efecto benéfico, pero no debe sobrepasar $1 \mu\text{M}$ o 0.5 mg kg^{-1} de Cr (Mengel y Kirkby, 1987; Shanker *et al.*, 2005; Jamal *et al.*, 2006). La fase gametofítica de *P. aquilinum* en ninguno de los tratamientos presentó disminuciones significativas en biomasa y clorofila con respecto al control. En los esporofitos sometidos a Cr tampoco hay disminución en las tallas de las plantas lo cual puede indicar que los sistemas de absorción y translocación de nutrientes se encuentran en funcionamiento, incluso hay un aumento de la biomasa en las partes aéreas por efecto del Cr. No se había citado que el Cr en las concentraciones manejadas en los experimentos aumentara la biomasa, ya que a tales concentraciones el metal es extremadamente tóxico en cualquier estado de oxidación que se encuentre (Sarma *et al.*, 2011; Vaiopoulou y Gikas, 2012).

La clorosis es uno de los efectos más notorios que provoca el Cr en las plantas, ya que induce la peroxidación de lípidos, lo que daña las membranas celulares y de los organelos incluidas las del cloroplasto, lo que ocasiona: degradación de la clorofila, desarreglo de los tilacoides e inhibición del transporte de electrones, lo que desencadena en la disminución de la tasa fotosintética. La clorosis en las plantas también se explica a que el Cr inhibe la absorción de metales como el Fe e inhibe la enzima Δ -aminolevulinico ácido deshidratasa, la cual es importante en la síntesis de clorofila (Hayat *et al.*, 2011; Vakili *et al.*, 2012). En ambas fases del ciclo de vida de *P. aquilinum* no se observa una disminución notoria en ninguno de los dos tipos de clorofila medidos. Esta condición probablemente se deba a un sistema antioxidante muy eficiente como se discutirá más adelante.

Para la mayoría de las plantas el Cr VI es tóxico o letal a una concentración de 100 mg Cr/kg (Monferrán *et al.*, 2012). En la fase gametofítica se rebasa esa concentración y no hay daños aparentes en los tratamientos de 600 y $800 \mu\text{M}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, esta fase es la etapa más sensible en el ciclo de vida de los helecho ya que son laminares de pocas células de grosor a monoestratificadas sin diferenciación tisular aparente de unos cuantos milímetros de área lo cual hace a esta fase la más vulnerable a condiciones medioambientales adversas (Fig. 7).

Que no muestre signos de toxicidad indica que posee mecanismos de homeostasis muy eficientes que a pesar de la cantidad de Cr que acumula (como se verá más adelante) mantiene estos parámetros estables.

En la fase esporofítica las plantas están expuestas a concentraciones cercanas a 1 000 mg Cr/kg y tampoco hubo daño, solo un ligero marchitamiento de las hojas maduras como se mencionó. La poca sensibilidad de la fase esporofítica a Cr VI es impresionante ya que se someten a altas concentraciones, por un periodo 168 h y las plantas son muy jóvenes (4 meses), quizás su sensibilidad disminuirá en plantas de mayor edad, aun así *P. aquilinum* se perfila como un especie interesante.

12.2 Bioacumulación de Cr en ambas fases del ciclo de vida de Pteridium aquilinum.

12.2.1 Fase gametofítica.

Esta fase del ciclo de vida de *P. aquilinum* alcanzó una acumulación máxima de 915 ± 116 mg Cr/kg peso seco a las 168 h sometidos a $800 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Fig. 10a). Los gametofitos expuestos a 50 y $600 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ alcanzan su máximo de acumulación a las 24 h, 67.8 ± 20.7 mg Cr/kg y 512.2 ± 44.7 mg Cr/kg peso seco, respectivamente y se mantiene constantes hasta el final de los tratamientos (Fig. 10a). También se observó que en todos los tratamientos de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ la acumulación dentro de sus tejidos es dependiente de una dosis, mayor concentración de Cr en el medio más acumulación. La fase gametofítica se ubica muy cercana a la hiperacumulación de acuerdo con el criterio de Jaffré *et al.*, (1976), Morel *et al.* (2002) y Branquinho *et al.* (2007), ya que acumula un valor muy cercano al 0.1% del metal peso seco dentro de sus tejidos. De acuerdo con el Shen y Liu, (1998) y Haque *et al.*, (2007) una planta es hiperacumuladora si absorbe de 10 a 500 veces la concentración del metal de interés con respecto al que se absorbe en condiciones normales, los gametofitos de *P. aquilinum* cumplen esta condición, ya que las plantas normalmente acumulan entre 0.2 y 5 mg Cr /kg peso seco (Barcelo y Poschenrieder, 1997; Haque *et al.*, 2007; Bini *et al.*, 2008) y

de acuerdo con nuestros resultados *P. aquilinum* acumula aproximadamente 180 veces más.

El mayor factor de bioacumulación fue de 56.2 ± 58.5 y se presentó en los gametofitos expuestos a $50 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ por 168 h, esto significa que el contenido de Cr dentro de los tejidos de la planta es 56 veces mayor a la concentración inicial del metal en el cultivo (Fig. 10b). El factor de bioacumulación en los tratamientos 200, 600 y $800 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ es de alrededor de 20 y se mantiene sin diferencias significativas durante los intervalos de tiempo muestreados.

En las primeras 24 h los gametofitos expuestos a Cr alcanzaron su máxima velocidad de remoción, para $50 \mu\text{M}$ fue de $1.4 \pm 0.3 \text{ mg Cr / l de medio/día}$, para $200 \mu\text{M}$ de $4.4 \pm 0.7 \text{ mg Cr / l de medio/día}$, para $600 \mu\text{M}$ de $9.54 \pm 1.7 \text{ mg Cr / l de medio/día}$, y finalmente para $800 \mu\text{M}$ fue de $13.5 \pm 0.7 \text{ mg Cr / l de medio/día}$ (Fig. 10c). Después de este intervalo de tiempo la velocidad de remoción decayó gradualmente llegando a su mínimo a las 168 h en todos los tratamientos. Esto nos indicia que la gran parte del Cr removido del cultivo se da en las primeras 24 h y a pesar que la especie no absorbe más Cr como se observa en la Fig. 10a, pueden existir otros mecanismo como la adsorción o incluso la precipitación del Cr.

La fase gametofítica tiene un porcentaje máximo de remoción de $47.8 \pm 15\%$ a las 168 h expuestos a $50 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. En el resto de los tratamientos con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ el porcentaje de remoción en promedio es menor al 30 % (Fig. 10d). Por lo tanto la fase gametofítica es más eficiente en remover bajas concentraciones de Cr.

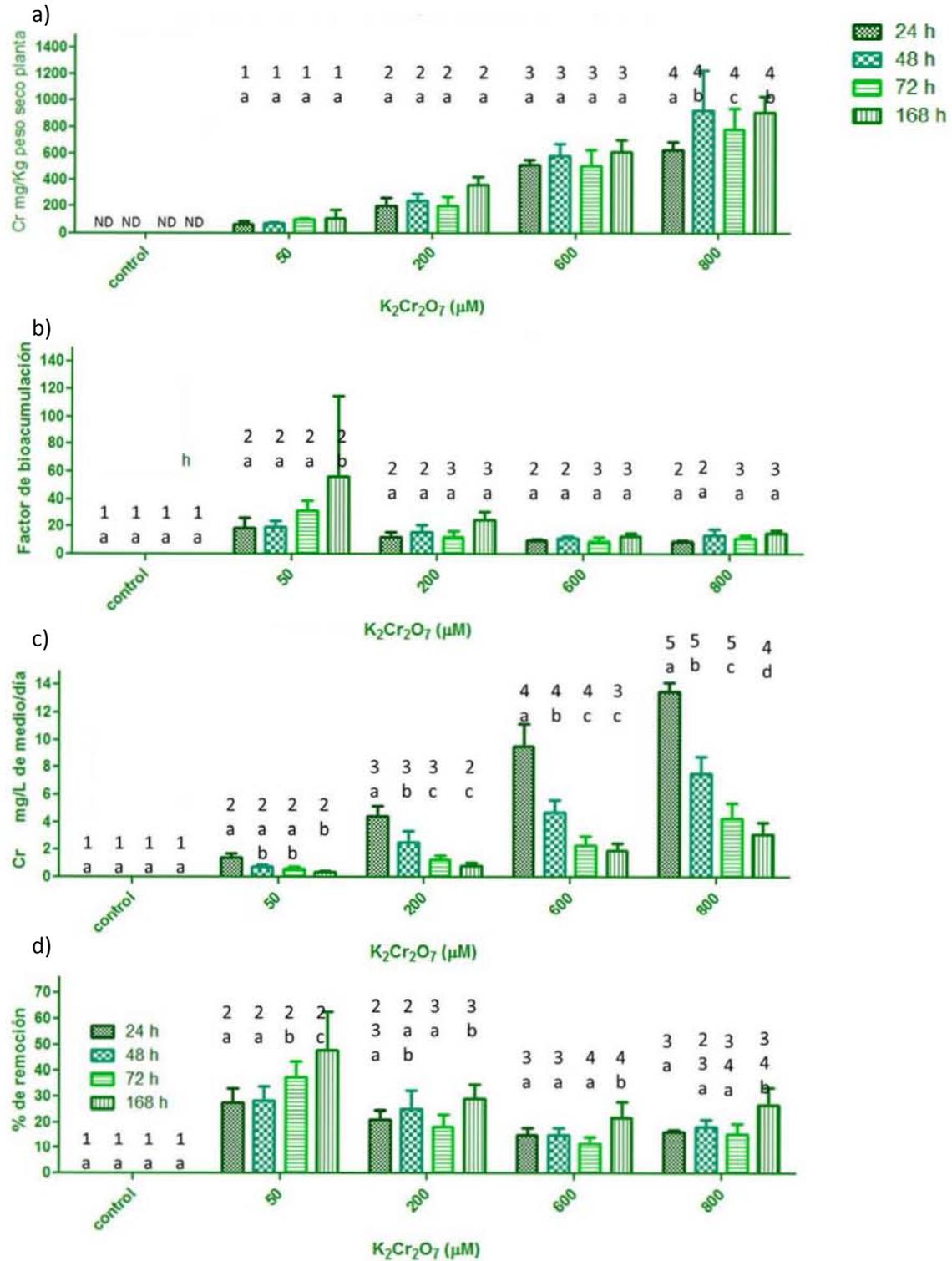


Fig. 10. Contenido de Cr en la fase gametofítica y en el medio de cultivo. a) Bioacumulación de Cr, b) Factor de bioacumulación, c) Velocidad de remoción del Cr del medio de cultivo, d) Porcentaje de remoción de Cr. Letra diferente indica diferencias significativas en un mismo tratamiento K₂Cr₂O₇ en los diferentes intervalos de tiempo y número diferente

indica diferencias significativas entre todos los tratamientos de $K_2Cr_2O_7$ en el mismo tiempo de muestreo. (DMS $p < 0.05$, $n=3$).

En el medio de cultivo de los gametofitos se determinó el Cr total y el Cr VI. El Cr siempre fue mayor que el Cr VI en todos los tratamientos ($p < 0.05$). A las 0 h fue: para 50 μM de 5.17 ± 0.059 Cr mg/l y 4.16 ± 0.06 Cr VI mg/l; para 200 μM 20.5 ± 0.2 Cr mg/l y 24.3 ± 0.3 Cr VI mg/l; para 600 μM 61.9 ± 0.6 Cr mg/l y 30.9 ± 0.5 Cr VI mg/l; finalmente para 800 fue de 82.35 ± 0.4 Cr mg/l y 37.16 ± 0.2 mg Cr VI/l (Fig. 11a y 11b). A pesar que al cultivo se le agregó Cr VI, este estado de oxidación es fácil que se reduzca por los componentes de la solución hidropónica como lo son $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. También se observó que a las 48 h el Cr VI decayó a 2 mg Cr VI/l en todos los tratamientos, mientras que el Cr total sí hubo una disminución significativa pero hasta las 168 h en todos los tratamientos.

El Cr VI en la solución hidropónica se reduce de manera espontánea, sin embargo esta reducción se incrementa con la presencia de las plantas (Fig. 11b y 11c). A 50 μM $K_2Cr_2O_7$ la reducción de Cr VI es igual en la solución hidropónica indistintamente de la presencia de los gametofitos. En los tratamientos 200, 600 y 800 μM $K_2Cr_2O_7$ el Cr VI decrece más rápido en presencia de la planta que sin ella, esta diferencia fue más notoria a las 24 h ($p > 0.05$) donde a 200 μM la concentración era de 2.6 ± 0.5 mg Cr VI/l con planta y 6.8 ± 0.1 mg Cr VI/l sin planta, 600 μM $K_2Cr_2O_7$ 3.7 ± 1.1 mg Cr VI/l con planta y 11.3 ± 3.1 mg Cr VI/l sin planta, 800 μM $K_2Cr_2O_7$ 4.4 ± 0.4 mg Cr VI/l con planta y 17 ± 1.5 mg Cr VI/l sin planta (Fig. 11b y 11c). Estos datos se deben que una parte del Cr VI es absorbido por la planta y otra fracción posiblemente esté siendo reducido por exudados de los gametofitos.

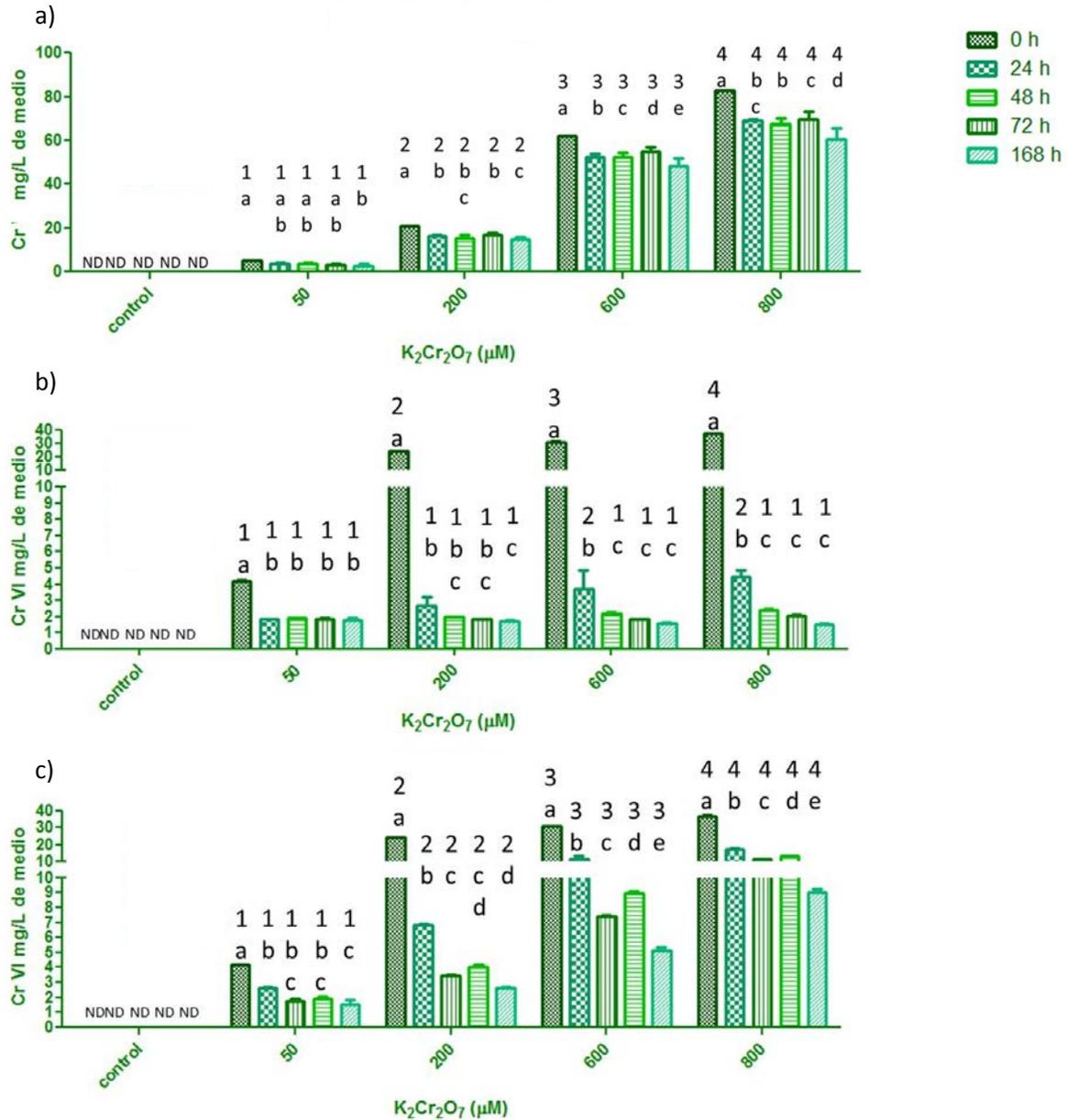


Fig. 11. Contenido de Cr en el medio de cultivo en la fase gametofítica. a) Cr total en el medio de cultivo, b) Cr VI en el medio de cultivo con gametofitos, c) Cr VI en el medio de cultivo sin gametofitos. Letra diferente indica diferencias significativas en un mismo tratamiento K₂Cr₂O₇ en los diferentes intervalos de tiempo y número diferente indica diferencias significativas entre todos los tratamientos de K₂Cr₂O₇ en el mismo tiempo de muestreo. (DMS p<0.05, n=3).

La biodisponibilidad de Cr en el cultivo es muy importante, como se observó entre las 0 h y 24 h es donde se encuentra la mayor cantidad de Cr VI, el estado de oxidación del metal disponible para la planta. Chandra y Kulshreshtha (2004) mencionan que el Cr VI, ya sea en forma de cromatos y dicromatos, entran a través de acarreadores específicos para sulfato, y las especies reducidas del

metal principalmente el Cr III es absorbido por difusión pasiva, más lento que la forma oxidada (Hossner *et al.*, 1998). En las primeras 24 h las plantas expuestas a 50, 200 y 600 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ alcanzaron su máximo de acumulación mientras que las plantas expuestas a 800 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ lo alcanzaron a las 48 h; en las primeras 24 h en todos los tratamientos se alcanza la velocidad máxima de remoción; y el factor de bioacumulación se mantiene constante en los tratamientos 200, 600 y 800 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Ya que después de las 24 h el Cr en el cultivo se encuentra en otro estado de oxidación más difícil de absorber por la planta y menos tóxico. El metal se sigue removiendo del cultivo pero estos cambios son notorios hasta las 168 h en todos los tratamientos donde se incrementa el porcentaje de remoción con respecto a los demás intervalos de tiempo (Fig. 10 b).

12.2.2 Fase esporofítica.

Los esporofitos alcanzaron su máxima acumulación de Cr sometidos a 6 400 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ por 168 h, en partes aéreas acumularon 2 240.6 \pm 193.2 mg Cr/kg peso seco y en partes subterráneas fue de 11 854 \pm 1071.9 mg Cr/kg peso seco (Fig. 12a y 12b).

En las partes aéreas solo en el tratamiento de 6 400 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ se observó un aumento en la acumulación conforme al tiempo, en los tratamientos de 800 y 1600 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ el contenido de Cr permaneció constante a partir de las 24 h. En el tratamiento de 800 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ el Cr acumulado en las partes aéreas osciló entre 27.5 \pm 20 mg Cr/kg peso seco y 175.1 \pm 87.76 mg Cr/kg peso seco y en 1600 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ fue entre 87.6 \pm 21.4 mg Cr/kg peso seco y 534.5 \pm 224.7 mg Cr/kg peso seco (Fig. 12 a).

Se observó que las partes subterráneas de los esporofitos expuestos a 800 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en las primeras 24 h llegó a su máximo de acumulación, 1 436.4 \pm 460.3 mg Cr/kg peso seco y se mantiene sin diferencias significativas a través del tiempo. A 1 600 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ la acumulación de Cr en las partes subterráneas se dio de forma creciente a través del tiempo, a las 24 h se tiene 2 256.8 \pm 1186.6 mg

Cr/kg peso seco y llega a un máximo de $7\,734.2 \pm 2795.2$ mg Cr/kg peso seco a las 168 h. En el tratamiento de $6\,400 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ también se observó este aumento de Cr en los tejidos conforme avanzó el tiempo, a las 24 h fue de $4\,831.4 \pm 869.8$ y a las 168 h llegó a $11\,854 \pm 1071.9$ mg Cr/kg peso seco, lo máximo que acumularon las plantas (Fig. 12 b).

El porcentaje de translocación de Cr de las partes subterráneas a las partes aéreas fue bajo, el mayor porcentaje se observó en los esporofitos expuestos a $6\,400 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ por 48 h donde 40 ± 26.69 % del Cr total de la planta se encuentra en las partes aéreas (Fig. 12c). En los individuos expuestos a $800 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ el porcentaje de translocación se mantuvo sin diferencias significativas a través del tiempo, entre 2.6 ± 1.8 % y 13.8 ± 8 %, esto se debe a que la acumulación Cr por las plantas en este tratamiento llegó a su máximo a las 24 h y se mantuvo constante en los demás intervalos. En el caso del tratamiento de $1\,600 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ el porcentaje de translocación también permaneció constante y osciló 18.8 ± 25.1 % y 5.9 ± 5.7 % (Fig. 12c).

La fase esporofítica acumula más Cr que la fase gametofítica sin lugar a duda. Esta fase cumple con todos los criterios para denominarla especie hiperacumuladora. Acumula en sus partes subterráneas en promedio 1.18% de Cr en peso seco y en las partes aéreas el 0.22% Cr peso seco, de acuerdo con los criterios Jeffré *et al.*, (1976) Morel *et al.*, (2002) Branquinho *et al.*, (2007) y Reeves y Baker (2000) es hiperacumuladora. Además la especie acumula en las partes subterráneas un promedio máximo de 11 854 mg Cr/kg lo que es 2 370.8 veces más de lo que una planta acumula de Cr en condiciones normales, es decir bajo el criterio de Shen y Liu, (1998) y Haque *et al.* (2007) también se considera una especie hiperacumuladora.

Sin embargo la fase esporofítica de *P. aquilinum* no cumple el criterio de Baker y Walker, (1989) y Baker *et al.*, (1994) que indica que el contenido del metal en los tejidos de la planta debe ser indudablemente mayor en las partes aéreas con respecto a las partes subterráneas para considerar a la especie hiperacumuladora.

P. aquilinum tiene un bajo porcentaje de translocación <50%. Este criterio en el caso de Cr puede ser descartado, ya que la mayor parte del metal absorbido por la plantas, entre ellas *P. aquilinum* se encuentra en las raíces y en bajas concentraciones en las partes aéreas. Una razón por la que el Cr se acumule más en raíces que en partes aéreas es porque el Cr entra a la planta por la vía del simplasto, es reducido a Cr III, una forma poco soluble y difícil de transportar, y es inmovilizado en las vacuolas de las células radiculares para reducir su toxicidad (Hayat *et al.*, 2011). Esta baja traslocación se ha visto en todas las plantas expuestas a sales de Cr sin ninguna excepción, ya que existen dos principales estrategias que las plantas emplean para defenderse contra metales, uno de ellos es la acumulación y el otro la exclusión. *P. aquilinum* utiliza la acumulación para evitar el daño del metal, pero una vez que el Cr está dentro de los tejidos utiliza una estrategia de exclusión, es decir evita que el Cr se distribuya por toda la planta y lo mantiene confinado, de ahí su bajo porcentaje de traslocación.

La hiperacumulación es un criterio que depende de muchas variables de la planta, la condición del suelo (pH, materia orgánica, intercambio catiónico) y el tipo de metal involucrado, en este caso el Cr. *P. aquilinum* en un criterio de consenso es hiperacumuladora de Cr VI y supera a plantas como *Datura innoxia*, *Hellaihtus annuus* *Prosopis* sp y supera por mucho al único helecho terrestre acumulador de Cr VI reportado en la literatura *Pteris vittata*. *P. aquilinum* solo es superado por *Convolvulus arvensis* como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Comparación entre *P. aquilinum* y las principales especies hiperacumuladoras de Cr.

Espece	Acumulación de Cr (mg Cr/Kg peso seco)	Fuente
<i>Convolvulus arvensis</i>	Raíz: >20 000 Brote: 3 800 Hoja: 2 150	(Gardea-Torresdey <i>et al.</i> , 2004)
<i>Pteridium aquilinum</i>	Rizoma-raíz: 11 854 Hojas: 2 240.6	Aportación de este trabajo.
<i>Hellaiutus annuus</i>	Raíz: 11 030 Tallo: 330 Hoja: 90.	January <i>et al.</i> , 2008
<i>Prosopis sp.</i>	Raíz: 10 983.8 Tallo: 2 262.9 Hoja: 991.5	Aldrich <i>et al.</i> , 2003
<i>Datura innoxia</i>	Raíz: 10469 Hoja: 83	Vernay <i>et al.</i> , 2008
<i>Pteris vittata</i>	Raíz: 5717 Tallo: 1145	Su <i>et al.</i> 2005

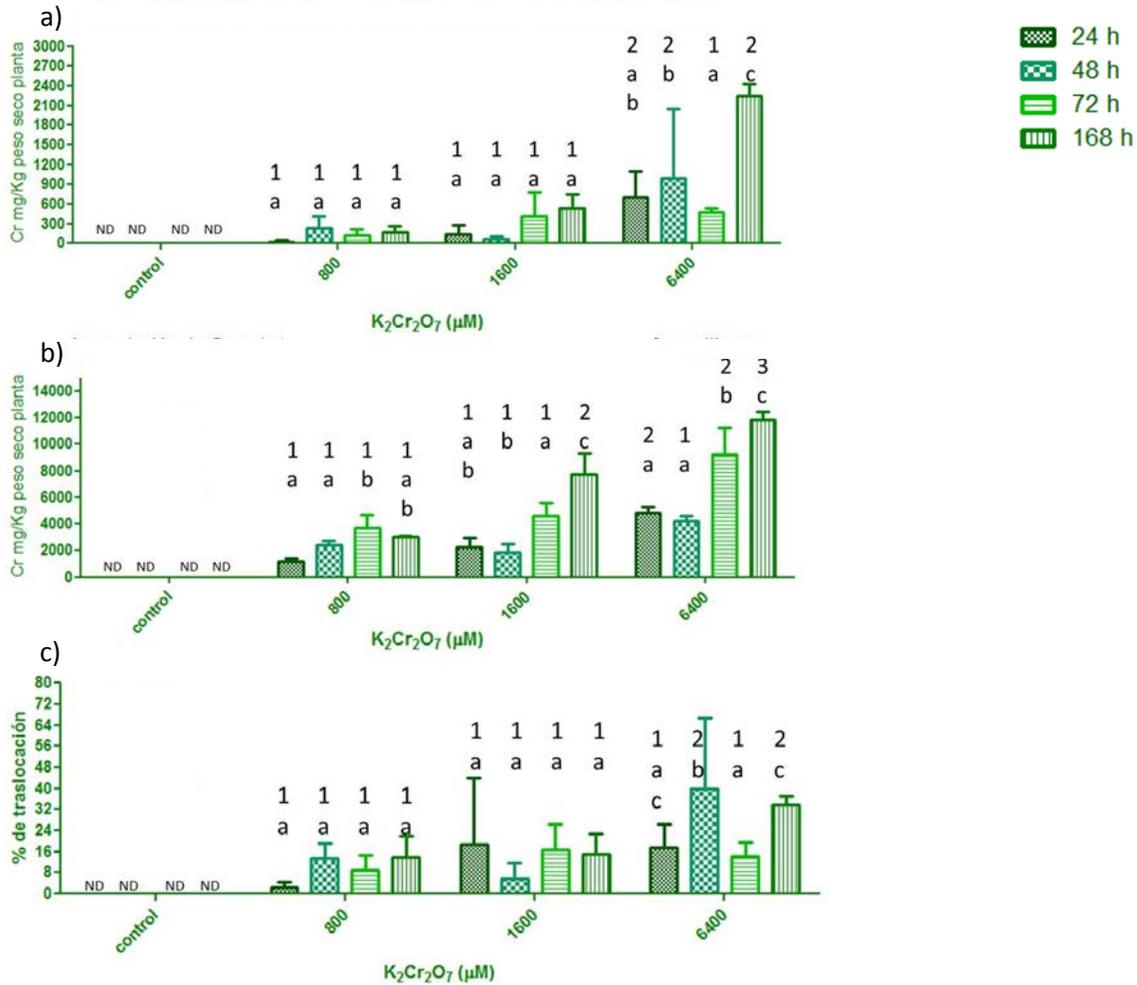


Fig. 12. Contenido de Cr en la fase esporofítica. a) Bioacumulación de Cr en las partes aéreas, b) Bioacumulación de Cr en las partes subterráneas, c) Porcentaje de translocación. Letra diferente indica diferencias significativas en un mismo tratamiento $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en los diferentes intervalos de tiempo y número diferente indica diferencias significativas entre todos los tratamientos de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en el mismo tiempo de muestreo. (DMS $p < 0.05$, $n = 3$).

La fase esporofítica con respecto a la gametofítica tiene un bajo factor de bioacumulación. El factor de bioacumulación más alto que la planta completa alcanzó a $800 \mu\text{M}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y fue de 4.4 ± 1.7 a las 48 h y se mantuvo sin diferencias significativas en el resto de tiempos de muestreo porque en este mismo intervalo se alcanzó el máximo de Cr que acumula la planta bajo estas condiciones. A $1600 \mu\text{M}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y $6400 \mu\text{M}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ el mayor factor de bioacumulación fue de 4.7 ± 1.9 y 3.14 ± 0.07 respectivamente, y se alcanzó a las 168 h (Fig. 13a).

Se determinó el factor de bioacumulación sólo tomando en cuenta las partes subterráneas, ya que es donde este órgano es el que acumula la mayor cantidad de Cr. Esto indica que la planta se puede usar como fitoestabilizadora. En los tratamientos de 1600 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y 6400 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, el mayor factor de acumulación se alcanzó a las 168 h con 13.1 ± 0.4 y 7.7 ± 0.7 respectivamente. En el caso del tratamiento 800 el factor de bioacumulación más alto fue de 16 ± 7.3 y se observó a las 72 h, sin embargo este incremento pudo haber sido causado porque durante el muestreo se seleccionaron azarosamente a los individuos más acumuladores del metal ya que a las 48 h y 168 h el factor de acumulación fue de 10.3 ± 2.8 y 13.1 ± 0.4 , valores significativamente menores que el de 72 h, pero sin diferencias significativas entre ellos ($p>0.05$) (Fig. 13b).

En esta fase al igual que la gametofítica la velocidad de remoción más alta se alcanzó en las primeras 24 h en todos los tratamientos. En 800 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ fue de 142.7 ± 17.9 mg Cr /kg/día, en 1 600 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ fue de 358.3 ± 18.6 mg Cr /kg/día y en 6 400 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ fue de $1\ 189.9\pm 73.7$ mg Cr /kg/día, en los demás intervalos de muestreo la velocidad decreció llegando a su mínimo a las 168 h como se observó en la fase gametofítica (Fig. 13c y Fig. 10c).

El mayor porcentaje de remoción se alcanzó en los tratamientos de 800 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y 1600 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ a las 72 h el cual fue de $88.8\pm 8.9\%$ y $83.9\pm 6.7\%$ respectivamente. En el tratamiento de 6 400 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ se alcanzó hasta a las 168 h y fue de $83.6\pm 4.2\%$ (Fig.13 d).

La velocidad de remoción de Cr y porcentaje de remoción nos indica que en las primeras 24 h la planta remueve la mayor parte del Cr en el cultivo, ya sea por acumulación y por adsorción del metal en la planta, este último parámetro no fue medido en los bioensayos realizados, pero parece jugar un papel muy importante, porque se remueve más Cr del medio del que las plantas acumulan.

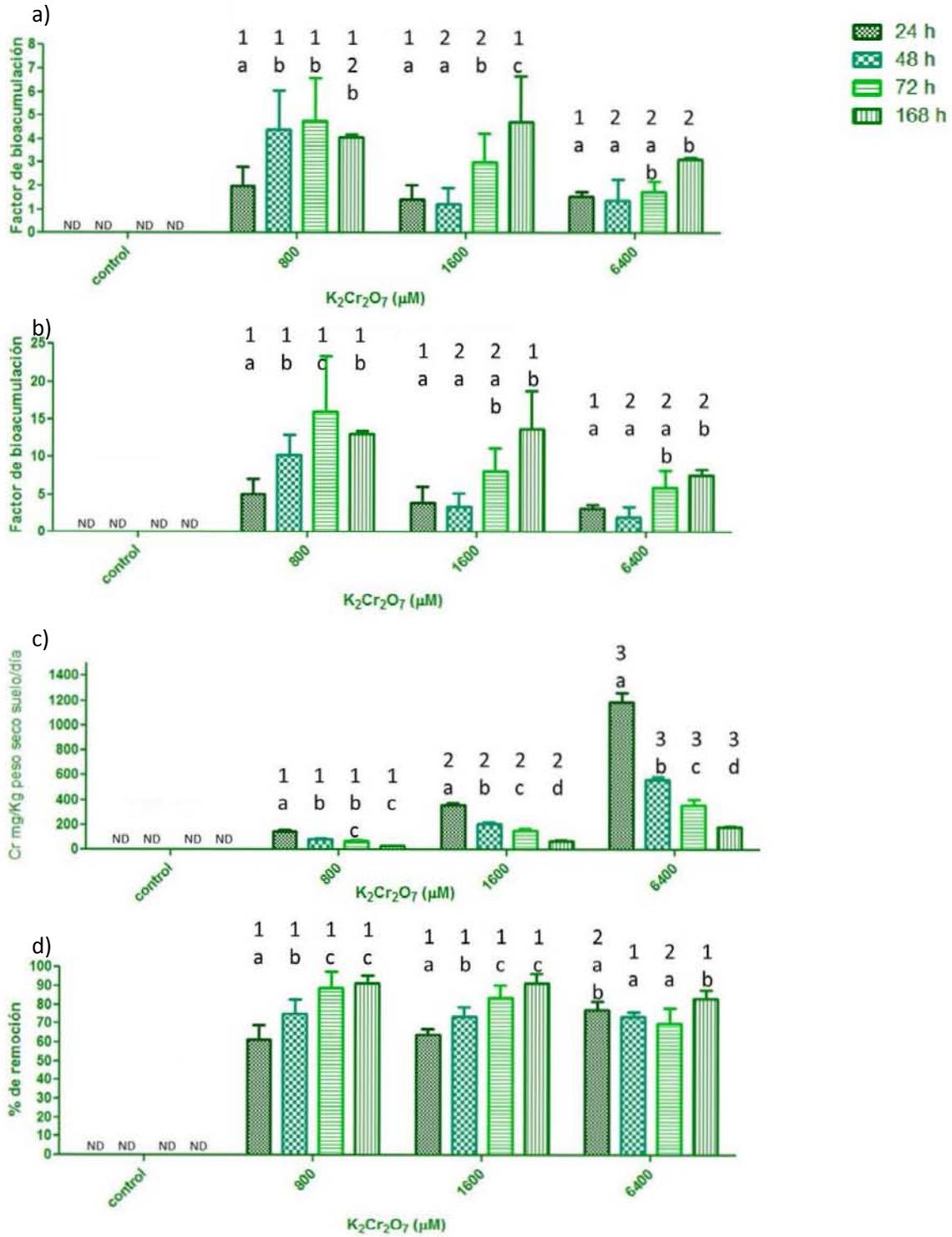


Fig. 13. Contenido de Cr en la fase esporófitica. a) Factor de bioacumulación de Cr en la planta entera, b) Factor de bioacumulación de Cr en las partes subterráneas, c) Velocidad de remoción de Cr en el cultivo, d) porcentaje de remoción de Cr en el cultivo. Letra diferente indica diferencias significativas en un mismo tratamiento $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en los diferentes intervalos de tiempo y número diferente indica diferencias significativas entre todos los tratamientos de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en el mismo tiempo de muestreo. (DMS $p < 0.05$, $n=3$).

Los esporofitos como se mencionó estuvieron en cultivos hidropónicos. Este tipo de cultivos tiene dos componentes, una fase líquida que contienen los nutrientes para la planta y una fase sólida que sirve como soporte mecánico. En la fase sólida (agrolita®) se determinó el Cr total inicial en peso seco, el tratamiento de 800 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ tuvo 232.4 \pm 101.9 mg Cr/kg, para 1 600 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ fue de 561.1 \pm 294.0 mg Cr/kg y por último para 6 400 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ fue de 1539.7 \pm 84.0 mg Cr/kg. En la fase líquida se cuantificó el Cr VI disuelto en la solución hidropónica, se obtuvo que la concentración era 5 y 10 veces menor que el Cr total cuantificado en la fase sólida, para 800 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ que fue de 45.9 \pm 2.2 Cr VI mg/l, para 1600 μM de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ fue de 73.8 \pm 2.5 mg Cr VI/l y para 6 400 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ fue de 162.9 \pm 40.4 Cr VI mg/l. Esta diferencia en el Cr VI inicial con respecto al Cr total se debe que a la solución nutritiva tiene un efecto de dilución, además de que se desconoce el volumen final de esta fase si bien se agregaron 100 ml de la solución hidropónica con las diferentes concentraciones de Cr el volumen previo no se cuantificó, aunado a que no se tiene la certeza que el 100% del Cr VI este en solución y cierta proporción pudo haberse adherido al sustrato. El Cr VI en el cultivo fue disminuyendo paulatinamente conforme al tiempo, pero fue menos abrupto a lo observado en la solución hidropónica de la fase gametofítica.

En los tratamientos de 800 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y 1600 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ la presencia de Cr VI decreció paulatinamente. La presencia de la planta no favoreció la disminución de Cr VI en el cultivo, en los cultivos con planta y sin planta la concentración del metal no tuvo diferencias significativas en los mismos intervalos de tiempo, se esperaba que el Cr VI disminuyera más rápido en la presencia de la planta, ya que en ese estado de oxidación es cuando es absorbido de manera más eficiente por la planta que en otros (Gardea-Torresdey *et al.*, 2004 (Fig. 11a y 11b). En el tratamiento de 6400 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ hubo una disminución gradual del Cr VI en presencia de la planta así como en su ausencia, pero fue más marcada en presencia de los esporofitos. A las 24 h fue de 77.7 \pm 10.8 mg Cr VI/l con planta y 144.2 \pm 20.3 mg Cr VI/l sin planta, a las 72 h fue 35.8 \pm 2.63 mg Cr VI/l con planta y 98.9 \pm 3.4 mg Cr VI/l sin planta, y a las 168 h 74.7 \pm 11.0 mg Cr VI/l con planta y 90.45 \pm 3.1 mg Cr VI/l sin

planta, este pequeño incremento de Cr VI a las 168 h se debió a que gran parte de la solución hidropónica ya se había evaporado y por lo tanto se habían concentrado las sales de Cr VI.

Determinar la concentración de Cr VI nos permitió ver el dinamismo del Cr en condiciones hidropónicas, el cual tuvo un comportamiento diferente al documentado en la fase gametofítica (cuando en las primeras 24 h disminuyó el 90% del Cr VI), esto se debe a que la fase sólida puede interactuar con el Cr y la evaporación de agua del cultivo concentra las sales del medio, lo que indica que durante los tratamientos con Cr la planta se enfrenta a condiciones distintas que van cambiando a través del tiempo lo cual repercute en su respuesta. Sin embargo se observa que la biodisponibilidad del Cr es un factor muy importante porque durante las 168 h en que los esporofitos estuvieron sometidos a las distintas concentraciones del metal estuvo presente Cr VI en el cultivo lo cual explica que las partes subterráneas de los esporofitos acumularan la mayor concentración de Cr a las 168 h y no alcanzarán su máximo a las 24 y 48 h como la fase gametofítica cuando ya casi no había Cr VI, lo cual se puede interpretar como una estrategia de exclusión en esta fase. Entre las 0 y 24 h hubo la mayor concentración de Cr VI en el cultivo lo que se relaciona que durante este periodo los esporofitos tuvieron su mayor velocidad de remoción del Cr del medio y se removiera entre el 60 y 70% del metal total en el cultivo.

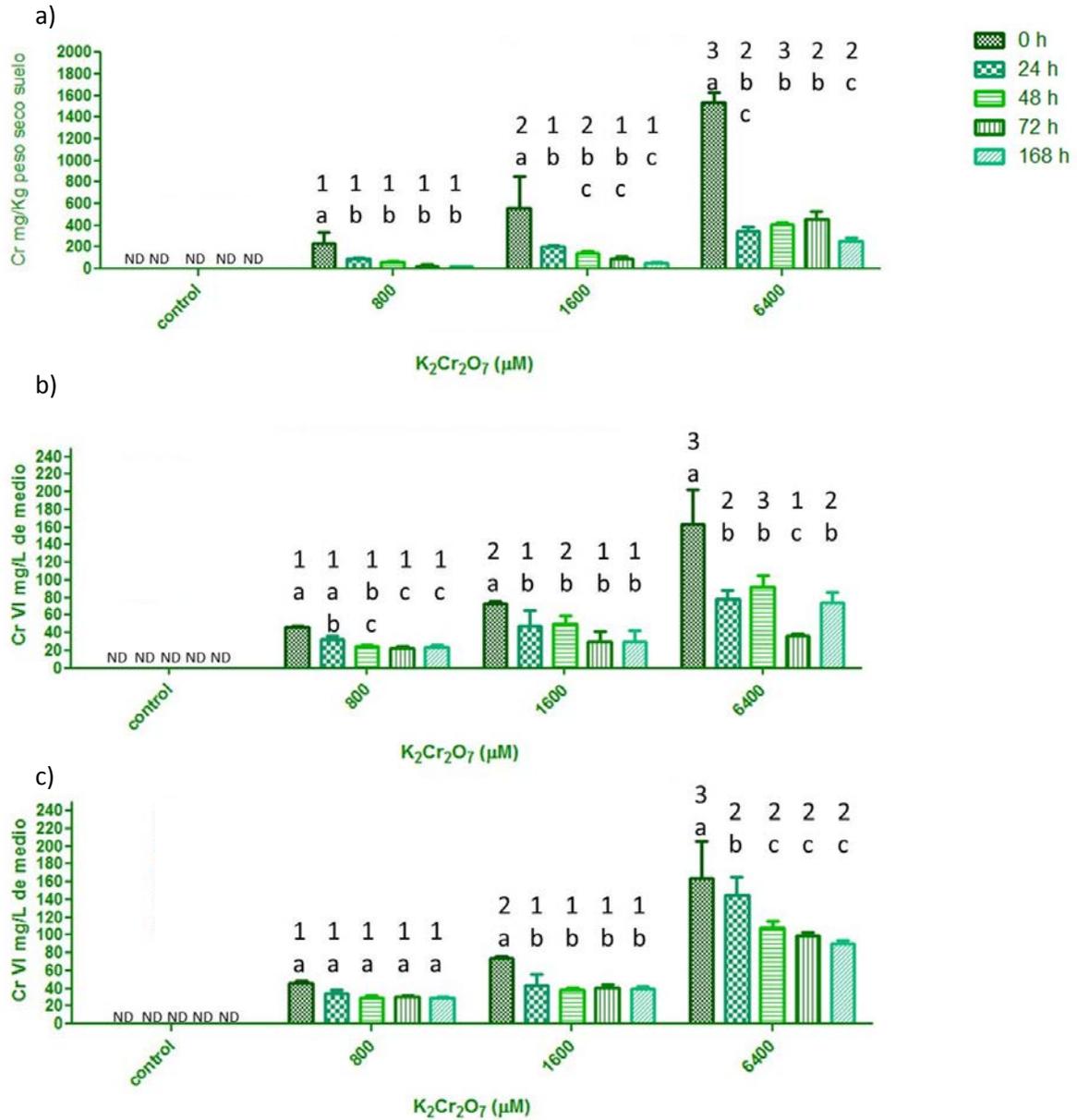


Fig. 14. Contenido de Cr en el cultivo de la fase esporófitica. a) Cr total en el cultivo, b) Cr VI en el cultivo en presencia de la planta, c) Cr VI en el cultivo en ausencia de la planta. Letra diferente indica diferencias significativas en un mismo tratamiento $K_2Cr_2O_7$ en los diferentes intervalos de tiempo y número diferente indica diferencias significativas entre todos los tratamientos de $K_2Cr_2O_7$ en el mismo tiempo de muestreo. (DMS $p < 0.05$, $n = 3$).

Por último, es importante mencionar que otro mecanismo de la planta para remover Cr del cultivo además de la acumulación, es la adsorción y que desafortunadamente en este estudio no se evaluó debido a que no habíamos valorado su importancia, pero en trabajos futuros se espera considerarlo.

12.3 Contenido de cisteína, glutatión y fitoquelatinas en los tejidos de *Pteridium aquilinum*.

12.3.1 Fase gametofítica.

Los gametofitos expuestos 200, 600 y 800 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ por 24 h mostraron un aumento en el contenido de cisteína, en un claro comportamiento dosis/respuesta: más Cr implica aumento de cisteína. En el tratamiento de 50 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ el contenido del aminoácido fue de 2.6 ± 0.4 nmol cys/ mg peso fresco y no tuvo diferencias significativas con respecto al control, 2.9 ± 0.4 nmol cys/ mg peso fresco. En los tratamientos restantes se observó en este mismo intervalo de tiempo un aumento significativo con respecto a sus controles ($p < 0.05$), seguido de una disminución gradual hasta regresar a su estado basal a las 168 h después de iniciado el tratamiento, para 200 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ fue de 4.9 ± 0.5 nmol cys/ mg peso fresco y decreció hasta 1.03 ± 0.1 nmol cys/ mg peso fresco, para 600 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ fue de 6.44 ± 0.4 nmol cys/ mg peso fresco y disminuyó a 2.0 ± 0.5 nmol cys/ mg peso fresco y finalmente para 800 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ a las 24 h se cuantificó que era de 7.9 ± 1.6 nmol cys/ mg peso fresco y regresó a su estado basal de 1.3 ± 0.4 nmol cys/ mg peso fresco a las 168 h (Fig. 15a).

Se observa que el contenido celular de cisteína está en función de la concentración de Cr a las que fueron expuestas las plantas y el mayor aumento se da a las 24 h, mismo intervalo donde la fase acumula el mayor porcentaje de Cr, esto se debe a que la cisteína es uno de los factores limitantes en la síntesis del glutatión, el glutatión es el principal compuesto involucrado contra el estrés oxidante que provocan los metales, entre ellos el Cr, por lo tanto para cubrir los requerimientos de glutatión en la célula es necesario un aumento en la síntesis de este aminoácido, estudios previos sugieren que el Cr probablemente sea activador de la enzima O-acetilserina (tiol) liasa comúnmente llamada serina acetil transferasa responsable de la síntesis de cisteína (Domínguez-Solís *et al.*, 2004, García-García 2008; García-García *et al.*, 2009). Otro punto importante de mencionar es que las fase gametofítica en esta especie tienen un bajo contenido

de cisteína con respecto a los otros compuestos tiolados cuantificados, esto se puede deber a que la mayoría de la cisteína sintetizada inmediatamente se incorpora en proteínas y en la γ -glutamil cisteína, precursor del glutatión, lo cual nos sugiere un alta actividad enzimática de fijación de aminoácido en la especie.

El contenido de glutatión+ γ -glutamil cisteína (GSH+ γ EC) en esta fase del ciclo de vida de la planta tuvo un comportamiento inusual, ya que en el control se observó un aumento de estos tioles de 25.2 ± 11.9 nmol GSH+ γ EC/mg peso fresco a las 24 hora hasta de 83.2 ± 30.8 nmol GSH+ γ EC/mg peso fresco a las 72 h (Fig. 15 b). Este aumento se pudo deber a dos razones, durante quince días los gametofitos estuvieron en medio $\frac{1}{2}$ MS antes de ser trasplantados al cultivo hidropónico e iniciar los experimentos, esto pudo ocasionar que las plantas al verse en un medio de rico en sulfato y ellas venir de un medio deficiente de él lo absorbieran rápidamente y lo fijaran en forma de glutatión, y por otro lado el trasplante para la especie pudo haber sido una condición de estrés y por lo tanto un aumento de estos compuestos tiolados. Aun así se observó que a altas concentraciones de Cr ($600 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y $800 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) hay un aumento de glutatión debido a la presencia del metal en el medio. A las 24 h se observa que a $600 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ aumenta a 88.6 ± 22.4 nmol GSH+ γ EC/mg peso fresco y a $800 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ fue de 65.9 ± 16.9 nmol GSH+ γ EC/mg peso fresco, teniendo diferencias significativas con respecto a su control el cual fue de 25.23 ± 11.9 nmol GSH+ γ EC/mg peso fresco (Fig. 15 b). A las 48 h en estos dos mismos tratamiento se observó un aumento de los compuestos al igual que su control por lo tanto este fenómeno pudo deberse a algún factor externo al Cr ya que a las 48 h la concentración de Cr VI era menos del 10% del presente en el medio a las 0 h. Además se observó que a las 168 h el contenido de estos compuestos sulfidrilos tanto en los tratamientos como en el control alcanzó un estado basal que osciló entre 109.3 ± 10.5 nmol GSH+ γ EC/mg peso fresco y 60.6 ± 9.4 nmol GSH+ γ EC/mg peso fresco ya que no se observaron diferencias significativas entre ellos, en este mismo intervalo de tiempo la mayoría

del Cr VI en el medio era menor a 1 mg CrVI/l por lo tanto no era motivo de estrés para la planta y tampoco se acumuló más Cr.

Los niveles de la fitoquelatina 2 se mantuvieron estables en el control y sus valores oscilaron entre 9.7 ± 0.8 nmol PC2/mg peso fresco y 10.3 ± 2.8 nmol PC2/mg peso fresco. Se observó un aumento de la fitoquelatina 2 en todos los tratamientos con Cr a las 48 h, en $50 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ fue de 13.6 ± 5.5 nmol PC2/mg peso fresco, en $200 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ de 16.7 ± 5.1 nmol PC2/mg peso fresco, en $600 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ de 16.5 ± 0.3 nmol PC2/mg peso fresco y en $800 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ de 15.9 ± 6.6 nmol PC2/mg peso fresco, entre las 72 y 168 h el contenido de fitoquelatina 2 disminuyó regresando a su estado basal, a las 168 h en $50 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ fue de 9.3 ± 2.0 nmol PC2/mg peso fresco, en $200 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ fue de 6.1 ± 4.2 nmol PC2/mg peso fresco, en $600 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ de 11.3 ± 1.8 nmol PC2/mg peso fresco y en $800 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ de 9.6 ± 2.2 nmol PC2/mg peso fresco (Fig. 15c). Sin embargo este aumento de fitoquelatina 2 no estuvo relacionado con la presencia de Cr, ya que el mayor porcentaje de Cr acumulado por la planta se observó en las primeras 24 h y permaneció sin diferencias significativas en el resto de los intervalos de tiempo (Fig. 10a), aunado a que a las 48 h, solo hay un 10% del Cr VI con respecto a cuantificado a las 0 h (Fig. 11b).

Las fitoquelatinas son inducidas por metales como Cd, Cu y Zn, debido a que se encuentran relacionados con la homeostasis de estos metales dentro de las células vegetales, aunado que estos metales son activadores de la enzima fitoquelatina sintasa (Clemens *et al.*, 2002; Hall, 2002). En el caso del Cr no se había citado que aumentara la producción de fitoquelatinas en plantas expuestas a él y en este trabajo concluimos que efectivamente el Cr no es un inductor de fitoquelatinas y este mecanismo no está involucrado con la resistencia y acumulación del metal en *P. aquilinum*.

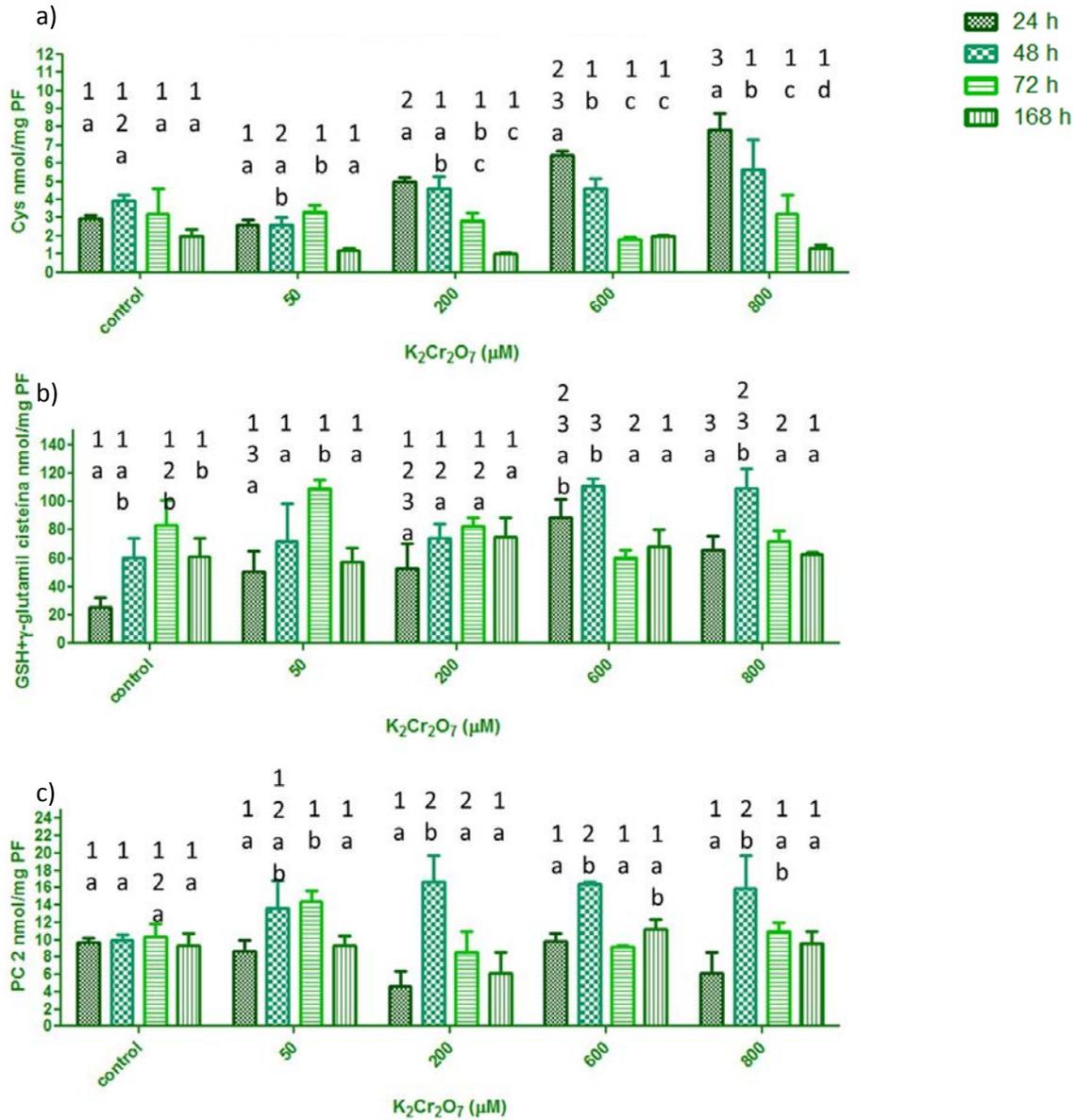


Fig. 15. Contenido de Cisteína, Glutación y fitoquelatina en la fase gametofítica. a) contenido de cisteína, b) contenido de Glutación+γ-glutamyl cisteína, c) Contenido de fitoquelatina. Letra diferente indica diferencias significativas en un mismo tratamiento K₂Cr₂O₇ en los diferentes intervalos de tiempo y número diferente indica diferencias significativas entre todos los tratamientos de K₂Cr₂O₇ en el mismo tiempo de muestreo. (DMS p<0.05, n=3).

En las primeras 24 y 48 h en las plantas sometidas a 600 μM K₂Cr₂O₇ y 800 μM K₂Cr₂O₇ se observó un aumento de glutación+γ-glutamyl cisteína dependiente de la dosis, por ello se realizó una correlación entre el contenido de glutación+γ-glutamyl/Cr total en la planta (Tabla 3) para saber si había suficiente de estos

compuestos para quelar el Cr acumulado y llevar a cabo las funciones metabólicas necesarias para la planta. Se descartaron el resto de los monotioles debido a que su concentración fue muy por debajo de la del glutatión+ γ -glutamil cisteína, además que en el caso de cisteína se descartó por su bajo contenido intracelular y la fitoquelatina 2 no mostró una correlación positiva en la relación dosis respuesta.

En la Tabla 2 se observa que en todas las condiciones probadas hay suficiente cantidad de glutatión+ γ -glutamil cisteína para quelar el metal, un mínimo de 77.8 nmol GSH+ γ EC por 1 nmol de Cr y un máximo de 1 221.4 nmol GSH+ γ EC por 1 nmol de Cr. Un alta cantidad de estos compuestos sugiere que hay suficiente cantidad de monotioles para quelar al Cr acumulado, enfrentar el estrés oxidante ocasionado con el Cr VI una vez dentro de la célula y cubrir los requerimientos metabólicos de la planta. Se considera que es posible la formación de complejos Cr-Glutatión cuando el metal se encuentra en la forma trivalente o hexavalente en una relación 1:3 para la trivalente y 1:6 en la hexavalente (Meister *et al.*, 1977; Madafiglio *et al.*, 1990; Brauer y Watterhahn, 1991; Brauer *et al.*, 1996). Los resultados obtenidos indican que el glutatión opera como un mecanismo de resistencia al Cr en la fase gametofítica de *P. aquilinum*, y para descifrar si es un mecanismo de acumulación sería necesario hacer bioensayos que nos permitan saber si el GSH está interactuando directamente con el Cr dentro de la célula vegetal, así como determinar la concentración del monotiol que se oxida para enfrentarse al estrés oxidativo (GS-GS) ocasionado por el metal y la fracción del monotiol necesario para llevar a cabo las funciones metabólicas en la especie.

Tabla 3. Relación entre contenido de glutati6n+g-glutamil cisteína y el Cr total acumulado por la especie en la fase gametofítica.

Tratamiento K ₂ Cr ₂ O ₇ (µM).	GSH (nmol/mg peso fresco)	Cr total (nmol/mg peso fresco)	<u>GSH nmol/mg</u> <u>Cr total</u> nmol/mg
24 h			
control	25.24	ND	--
50	50.33	0.06	841.7
200	52.93	0.18	300.5
600	88.58	0.45	195.9
800	65.98	0.55	118.9
48 h			
control	60.81	ND	--
50	71.98	0.06	1136.8
200	74.39	0.21	349.0
600	110.51	0.52	214.0
800	108.94	0.82	133.6
72 h			
control	83.20	ND	--
50	109.30	0.09	1221.4
200	82.80	0.18	457.2
600	60.60	0.45	134.6
800	71.70	0.69	103.8
168 h			
control	61.21	ND	--
50	57.39	0.10	562.9
200	74.67	0.32	234.4
600	68.10	0.54	125.1
800	62.84	0.81	77.8

12.3.2 Fase esporofítica.

En esta fase del ciclo de vida de *P. aquilinum* el contenido de cisteína en las partes subterráneas de la planta no se vieron afectadas en los diferentes tratamientos con Cr. Se observó un incremento de este aminoácido a las 168 h en los esporofitos expuestos a 1600 µM K₂Cr₂O₇ de 7.8±2.8 nmol cys/ mg peso fresco y en el tratamiento de 6400 µM K₂Cr₂O₇ a las 72 h de 6.9 ±0.8 nmol cys/ mg peso fresco y a las 168 h de 7.72±0.8 nmol cys/ mg peso fresco, este aumento se

puede deber a que en estas mismas condiciones fue donde se alcanzó la mayor acumulación del metal (Fig. 17a). Como se mencionó anteriormente el Cr probablemente es un activador de la enzima O-acetilserina (tiol) liasa por ello al aumentar el contenido de Cr dentro de la célula aumenta la concentración de cisteína, sin embargo se esperaría que fuera en los primeros intervalos de tiempo como se observó en la fase gametofítica no al final, por lo que cabe la posibilidad que la acumulación de cisteína que estamos observando se debe a que se está fijando a una velocidad menor en proteínas y en γ -glutamil cisteína causado porque la planta no puede mantener la homeostasis a nivel celular por el exceso de Cr en la célula y se está comprometiendo la actividad enzimática por el efecto oxidante del metal.

El contenido de glutatión+ γ -glutamil cisteína en los controles se mantiene constante a través del tiempo y osciló entre 16.99 ± 8.0 nmol GSH+ γ EC/mg peso fresco y 28.5 ± 34.0 nmol GSH+ γ EC/mg peso fresco, lo cual indica que no hay un factor de estrés además del Cr, caso contrario al que se observó en la fase gametofítica. A $800 \mu\text{M}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ se observa un aumento en los niveles de glutatión+ γ -glutamil cisteína a las 24 h y 48 h, de 74.8 ± 28.8 nmol GSH+ γ EC/mg peso fresco y 115.9 ± 25.9 nmol GSH+ γ EC/mg peso fresco, respectivamente y a las 72 se vio un decremento del contenido del monotiolo a su estado basal, 29.0 ± 9.6 nmol GSH+ γ EC/mg peso fresco, que se mantuvo hasta el final del tratamiento. En los tratamientos de dosis más altas se observó que el contenido de glutatión+ γ -glutamil y el Cr al que eran expuestas las plantas no tuvieron relación dosis/respuesta (Fig. 17b). Este fenómeno se discutirá más adelante.

En las corridas del HPLC se cuantificó un compuesto tiolado con un tiempo de retención de ~ 4.5 min, su respuesta no es dependiente de la dosis de Cr al que fueron expuestas las plantas (Fig. 16). Probablemente su respuesta está en función de alguna variable que no se pudo controlar durante el experimento en hidroponía, ya que en el control se observa una reducción gradual de este compuesto a través del tiempo, a las 24 h era de 131.9 ± 40.3 nmol TR 4.5/mg peso

fresco, a las 48 era de 85.9 ± 5.8 nmol TR 4.5/mg peso fresco y hasta llegar un mínimo a las 168 h de 12.4 ± 4.6 nmol TR 4.5/ mg peso fresco (Fig. 17c). Lo interesante de este compuesto radica en que tiene una gran concentración en la célula vegetal, en la literatura se menciona que en todos los seres vivos, incluidos las plantas, el reservorio de azufre reducido por excelencia es el glutatión y el que se encuentra en mayor proporción dentro de la célula (Yadav, 2010), sin embargo aquí se observa este compuesto desconocido dentro de la célula en mayor proporción que el glutatión y está relacionado con la vía de asimilación azufre como posible molécula de reserva de azufre reducido, lo cual lo hace un interesante objetivo para incrementar el conocimiento de esta vía en *P. aquilinum* y que no se había citado para otras plantas.

El contenido de fitoquelatina 2 como se vio en la fase gametofítica tampoco se ve afectada en esta fase del ciclo de vida del helecho. Ya que el Cr no es un buen inductor para la síntesis de este polipéptido y por lo tanto no está relacionado con los mecanismos de resistencia y acumulación en esta especie (Fig. 17d).

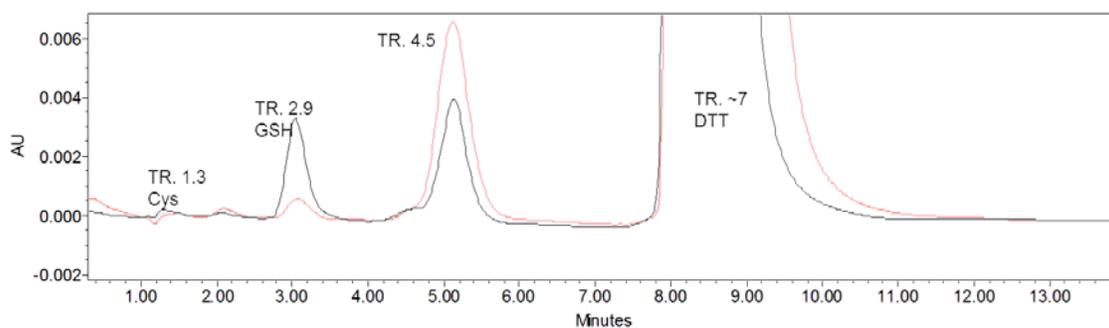


Fig. 16. Cromatogramas de las partes subterráneas del esporofito, con especial énfasis en el compuesto con un tiempo de retención de 4.5 min. En rojo control, en negro expuestos a $800 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ por 24 horas.

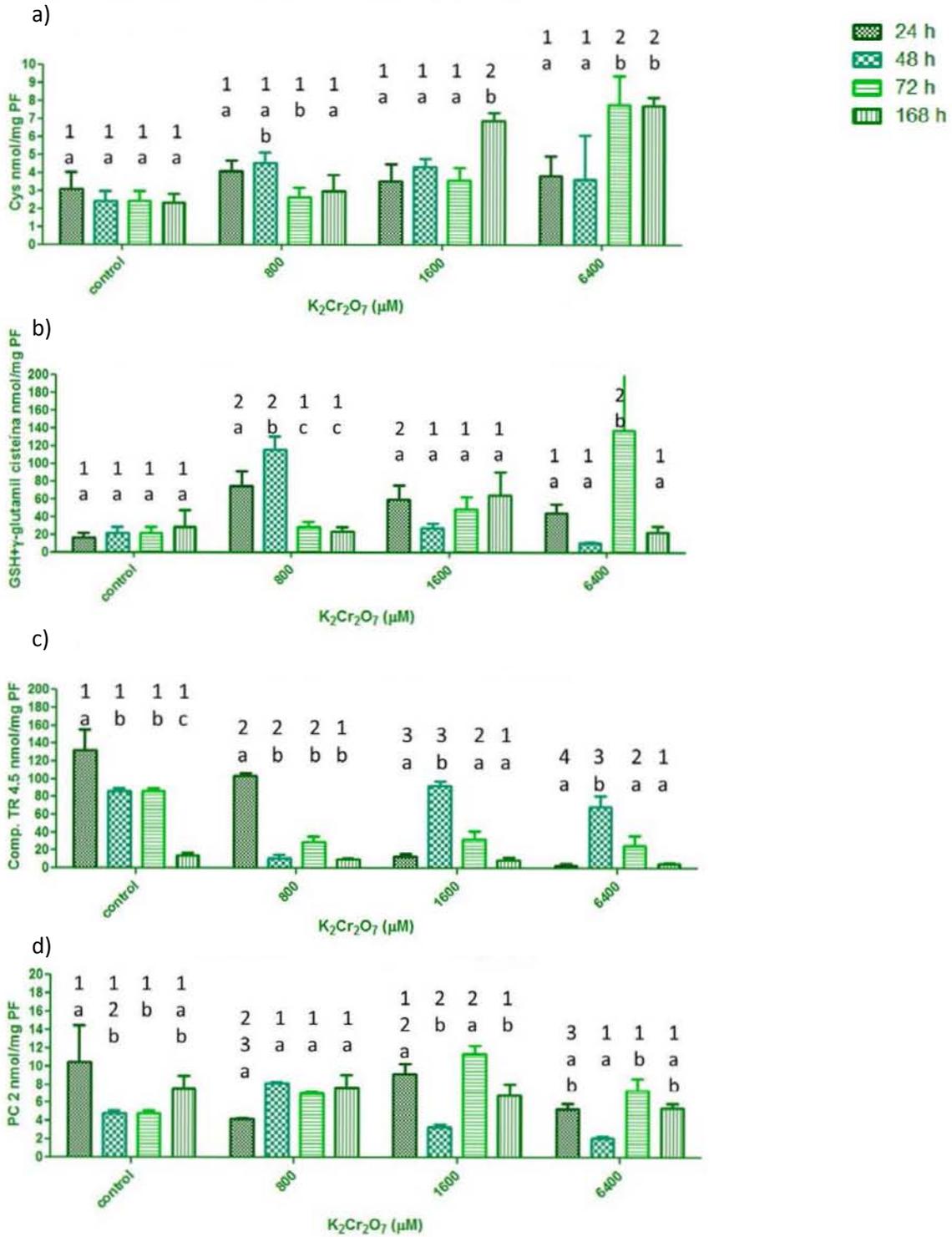


Fig. 17. Contenido de Cisteína, Glutación y fitoquelatina en la fase esporofítica. a) contenido de cisteína, b) contenido de Glutación+γ-glutamyl cisteína, c) Contenido de compuesto desconocido con tiempo de retención de 4.5 min, d) contenido de fitoquelatina 2. Letra diferente indica diferencias significativas en un mismo tratamiento K₂Cr₂O₇ en los diferentes intervalos de tiempo y número diferente indica diferencias significativas entre todos los tratamientos de K₂Cr₂O₇ en el mismo tiempo de muestreo. (DMS p<0.05, n=3).

Se hizo una relación del contenido de Cr acumulado y el contenido de glutatión+ γ -glutamil cisteína como se muestra en la Tabla 4. Se observó que la cantidad de glutatión+ γ -glutamil cisteína no es el suficiente para quelar al Cr absorbido por la planta y llevar a cabo las rutas metabólicas donde se encuentra involucrado esos monotioles. EL GSH en concentraciones moderadas de metales aumenta como se vio en el tratamiento de 800 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, sin embargo el uso masivo de GSH para la detoxificación de metales resulta en una disminución de éste en la célula, probablemente por la actividad de la enzima s-transferasas que unen al glutatión a xenobióticos tanto elementos como compuestos químicos y en esta forma no se pueden medir (Zhu *et al.*, 1999), quizás por eso en los tratamientos de 1 600 y 6 400 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ el glutatión sube y baja su contenido sin una relación aparente con el Cr pues se produce en grandes cantidades y se degrada a una velocidad de igual a mayor y de ahí surge esta incertidumbre. Para probar esta hipótesis sería pertinente ver la expresión de mRNA que traduce para la glutatión sintetasa y s-transferasas y ver si aumenta en presencia del metal y la relación existente entre ellas, o bien el glutatión no está involucrado en la resistencia y acumulación en esta fase esporofítica de *P. aquilinum*. Las moléculas responsables de esta propiedad quizás no se midieron en este estudio, por ejemplo las metalotioneínas tipo II. Aun no se tienen suficientes pruebas experimentales para aceptar o descartar algunas de estas dos posibilidades.

Tabla 4. Relación entre contenido de glutati6n+g-glutamyl cisteína y el Cr total acumulado por la especie en la fase espor6fita.

Tratamiento K ₂ Cr ₂ O ₇ (µM).	GSH (nmol/mg peso fresco)	Cr total (nmol/mg peso fresco)	<u>GSH nmol/mg</u> <u>Cr total</u> nmol/mg
24 h			
control	16.99	ND	--
800	74.80	3.36	22.2
1600	59.28	5.29	11.2
6400	45.03	11.32	4.0
48 h			
control	21.25	ND	--
800	115.95	5.58	20.8
1600	27.89	5.47	5.1
6400	11.02	9.89	1.1
72 h			
control	21.25	ND	--
800	29.09	8.74	3.3
1600	48.60	10.76	4.5
6400	137.77	21.63	6.4
168 h			
control	28.48	ND	--
800	24.02	7.16	3.4
1600	64.21	18.11	3.5
6400	22.41	27.76	0.8

12.3.3 Algunas consideraciones para ambas fases del ciclo de vida.

En este trabajo se dilucidaron algunos mecanismos de resistencia para las dos fases del ciclo de vida de *P. aquilinum*. Se enfocó en los compuestos tiolados, productos de la vía de asimilación del azufre, ya que las moléculas tioladas de bajo peso molecular muestran gran afinidad hacia los metales tóxicos, entre ellos el Cr. El glutati6n demostró ser un excelente candidato. El glutati6n tiene un grupo tiol de naturaleza nucleofílica de alta afinidad por densidades positivas, lo que es muy importante para interactuar con los metales, es muy reactivo, con una estabilidad relativamente alta y con una gran solubilidad en agua, lo cual lo hace el candidato ideal para proteger a las plantas contra el estrés oxidante, metales pesados y ciertos compuestos orgánicos. A pesar de que el glutati6n no interactue

directamente con el Cr, participa en el control del estrés oxidante producido por los metales de transición una vez dentro de la célula.

Acerca de la interacción directa de GSH y el Cr, la teoría ácido-base duro-blando propuesta por Paerson en 1963, indica que el Cr es un ácido duro, por tal motivo son más estables las interacciones que se establezcan con un base dura por ejemplo compuestos que tengan grupos hidróxidos o carbonilos, que con bases blandas como lo serían SH que efectivamente pueden interactuar sin embargo la estabilidad de dicho complejo sería menor como lo corrobora el trabajo de Brauer y Wetterhahn (1991), donde el Cr forma complejos con el GSH pero son poco estables. En el caso de un modelo biológico es muy importante este tipo de reacciones para descartar posibles interacciones, sin embargo hay ciertas enzimas que pueden favorecer la formación de enlaces como GSH-Cr como las S-transferasas. Pero la teoría de Paerson (1963) da la pauta para investigar otras moléculas que tienen una función quelante, como lo son los ácidos orgánicos que en este trabajo no se estudiaron y que podrían tener un papel importante como mecanismos de acumulación de Cr en *P. aquilinum*.

El glutatión está involucrado en la detoxificación del ROS a través del ciclo ascorbato-glutatión, lo cual da pauta a investigar nuevas moléculas, ya que en este ciclo el H_2O_2 es reducido a H_2O por medio de la ascorbato peroxidasa (APX) usando como dador de electrones al ascorbato. El monodeshidroascorbato producto de la oxidación del ascorbato es regenerando por monodeshidroascorbato reductasa (MDAR) que lo reduce a deshidroascorbato que a su vez es reducido a ascorbato por medio de la enzima deshidroascorbato reductasa usando como donador al glutatión y oxidándolo en GS-SG el cual es reducido por la glutatión reductasa que usa como donador de electrones al NADPH (Zhu *et al.* 1999; Yadav, 2010). Por lo tanto el GSH es muy importante para la reducción de las ROS sin embargo es necesario saber el contenido de ascorbato, una molécula interesante que en este estudio no se planteó, pero como se mencionó es de vital importancia además del glutatión para defender a la célula contra el estrés oxidante ocasionado por el Cr. Además se plantea que la sobreexpresión del GSH

y del ascorbato pueden aumentar la capacidad de acumulación de metales en las plantas, quizás para el Cr tenga la misma función (May et al., 1998).

Por último, cabe señalar que el mecanismo que comparten ambas fases del ciclo de vida de este helecho, y que les permiten resistir Cr, como se planteó al inicio de este estudio el GSH. Sin embargo la fase gametofítica parece tener un mecanismo adicional: los exudados que reducen al Cr VI en el cultivo, quizás la fase esporofítica también la presente, pero no tuvo un efecto tan notorio como en la fase gametofítica en donde el Cr VI en presencia de la planta se redujo más rápido que en su ausencia.

13 Conclusiones

13.1 Fase gametofítica

Es poco sensible a la presencia de Cr ya que su biomasa y niveles de clorofila no se ven afectados en estas concentraciones e intervalos de tiempo.

Es hiperacumuladora de Cr, 915 mg/Kg PS, tiene un factor de bioacumulación máximo de 56.2 ± 58.5 , remueve entre el 50 y 30 % de Cr del medio de cultivo a las 168 horas posteriores a su siembra, tiene una velocidad de remoción máxima de 13.5 ± 0.7 mg Cr /l de medio/día. Lo cual la hace un excelente candidata para ser aplicada en procesos de remediación cuando la concentración de Cr en baja.

El GSH tiene aumento en la presencia de Cr a las 24 y 48 horas y es dependiente de la dosis y se tiene el requerimiento necesario de este monotiol para quelar el Cr en cualquier estado de oxidación en que se encuentre dentro de la célula y cumplir sus funciones metabólicas normales.

13.2 Fase esporofítica

Es poco sensible a la presencia de Cr, solo a muy altas concentraciones (6400mM por 72 y 168 horas) presenta disminución en la clorofila a, pero su biomasa permanece constante.

Es una especie hiperacumuladora, acumula en las partes subterráneas un máximo de 11 850 Cr mg/ Kg peso seco, (168 h, 6400 μ M), tiene un porcentaje de traslocación máximo de 40 ± 26.69 %, el facto de bioacumulación máximo fue ne la planta entera de 4.7 ± 1.9 , su factor de bioacumulación en partes subterráneas fue de 13.1 ± 0.4 y la velocidad mejor velocidad de remoción es 1189.9 ± 73.7 mg Cr /Kg/día. Debido a estas cualidades esta fase de *P. aquilinum* la hacen una excelente candidata para fitoestabilizar el Cr en campo o usarse en procesos de rizofiltración.

El GSH aumenta en presencia de Cr únicamente en el tratamiento de 800 μ M, en el resto de los tratamientos debido a las altas cantidades de Cr dentro de la célula el glutatión se puede estar degradando más rápido de lo que se sintetiza y por lo tanto no se puede medir.

13.3 Para ambas fases

A pesar de tener una diferencia estructural y tisular tan diferente, ambas fases parecen tener mecanismos en común y respuestas en común en presencia de Cr para resistirlo y acumularlo, el GSH. Además la fase gametofítica represento una ventaja experimenta ya que la mayoría de los estudios fueron estandarizados en esta fase por su fácil manejo y su rápido crecimiento a comparación de la fases esporofítica.

14 Bibliografía

- Aldrich M., J. Gardea-Torresdey, J. Peralta-Videa y J. Parsons (2003) Uptake and Reduction of Cr(VI) to Cr(III) by Mesquite (*Prosopis* spp.): Chromate-Plant Interaction in Hydroponics and Solid Media Studied Using XAS. *Environmental Science Technology*. 37: 1859-1864.
- Anderson, J.W. 1981. Light-energy-dependent processes other than CO₂ assimilation. In: *The Biochemistry of Plants* vol. 8. Photosynthesis. Academic Press, Inc. New York. Pp. 473-500.
- Arora A., S. Saxena y D. Sharma (2006) Tolerance and phytoaccumulation of Chromium by three *Azolla* species. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 22: 97–100.
- Arthur E., P. Rice, P. Rice, A. Anderson, S. Baladi, K. Henderson y J. Coats (2005). Phytoremediation—An Overview. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 24 (2): 109–122.
- Baker A., S. McGrath, C. Sidoli y R. Reeves (1994) The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resources, Conservation and Recycling*. 11 (1–4): 41–49.
- Barcelo J. y C. Poschenrieder (1997) Chromium in plants. In: Canali, S., Tittarelli, F., Sequi, P. (Eds.), *Chromium Environmental Issues*". Angeli, Milano, pp. 101–130.
- Benavides A. (1998) El azufre en plantas.
http://www.abenmen.com/a/azufre_en_plantas.pdf consultado diciembre del 2010.
- Bini C., L. Maleci y A. Romanin. (2008) The chromium issue in soils of the leather tannery district in Italy. *Journal of Geochemical Exploration*. 96 (2-3): 194–202.

- Branquinho C., H. Serrano, M. Pinto, y M. Martins-Louçao (2007) Revisiting the plant hyperaccumulation criteria to rare plants and earth abundant elements. *Environmental Pollution*. 146 (2): 437-443.
- Brauer SL, Hneihen AS, McBride JS, Wetterhahn KE. (1996) Chromium (VI) forms thiolate complexes with glutamylcysteine, N-acetylcysteine, and methyl ester of N-acetylcysteine. *Inorg Chem*. 35:373–81.
- Brauer SL, Wetterhahn KE. (1991) Chromium (VI) forms thiolate complex with glutathione. *Journal of American Chemical Society*. 113:3001– 3007.
- Chandra P. y K. Kulshreshtha (2004) Chromium acumulation and toxicity in aquatic vascular plants. *The botanical review*. 70 (3): 313-327.
- Clemens S., M. Palmgren, y U. Krämer (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *TRENDS in Plant Science*. 7(7): 309-314.
- Dolling A. (1999) The vegetative spread of *Pteridium aquilinum* in a hemiboreal forest invasion or revegetation? *Forest Ecology Management*. 24(2-3): 177–184.
- Domínguez-Solís J., Lopéz-Martín M., Ager F., Ynsa M., Romero C. y Gotor C. (2004) Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology Journal*. 2: 469–476.
- Eapen S. y S. D'Souza (2005) Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology Advances*. 23 (2): 97– 114.
- EPA 3052. http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-74217APP_MicrowaveDigestionMultiwave.pdf
- Eslava F. (2009) *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn especie hiperacumuladora de cromo hexavalente. Facultad de Ciencias UNAM. México D.F. 89 pp.
- Evans L. y C. Conway (1980) Effects of Acidic Solutions on Sexual Reproduction of *Pteridium aquilinum*. *American Journal of Botany*. 67(6): 866-875.

- Evans L. y D. Bozzone (1977) Effect of buffered solutions and sulfate on vegetative and sexual development in gametophytes of *Pteridium aquilinum*. *American Journal of Botany*. 64(7): 897-902.
- Fernández R., A. Bertranda, J. Garcíab, R. Tamésa y A. González. (2012) Lead accumulation and synthesis of non-protein thiolic peptides in selected clones of *Melilotus alba* and *Melilotus officinalis*. *Environmental and Experimental Botany*. 78: 18– 24.
- García-García D. (2008) Mecanismo de resistencia y acumulación de cromo en le protista *Euglena gracilis*. Tesis de maestría, UNAM. México DF. 98pp.
- García-García J., Rodríguez-Zavala J., Jasso-Chavez E., Mendoza-Cozatl E. y Moreno Sánchez R. (2009) Chromium uptake, retention and reduction in photosynthetic *Euglena gracilis*. *Arch Microbiol*. 191:431–440
- Gardea-Torresdey J., J. Peralta-Videa, M. Montes, G. de la Rosa y B. Corral-Diaz (2004) Bioaccumulation of cadmium, chromium and copper by *Convolvulus arvensis* L.: impact on plant growth and uptake of nutritional elements. *Bioresource Technology*. 92 (3): 229–235.
- Gliessman S. (1978) The establishment of bracken following fire in tropical habitats. *American Fern Journal*. 68 (2): 41-44.
- Gumaelius L., B. Lahner, D. Salt y J. Banks (2004) Arsenic Hyperaccumulation in Gametophytes of *Pteris vittata*. A New Model System for Analysis of Arsenic Hyperaccumulation. *Plant Physiology*. 136: 3198–3208.
- Hall J. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 53: 1-11.
- Haque, N., J. Peralta-Videa, G. Jones, T. Gill y J. Gardeas-Torresdey (2007) Screening the phytoremediation potential of desert broom (*Baccharis sarothroides* Gray) growing on mine tailings in Arizona, USA. *Environmental Pollution*. 153(2): 362-368.

- Hayat S., G. Khalique, M. Irfan, A. Wani, B. Tripathi y A. Ahmad (2011) Physiological changes induced by chromium stress in plants: an overview. *Protoplasma*. 1-13.
- Hossner L., R. Loeppert, R. Newton, P. Szaniszlo y M. Attrep (1998) Literature review: phytoaccumulation of chromium, uranium, and plutonium in plant systems. Amarillo National Resource Center for Plutonium. Mayo. 57 pp.
- Jaffré T., R. Brooks, J. Lee y R. Reeves (1976) *Sebertia acuminata*: hiperaccumulator of nickel from New Caledonia. *Science*. 193: 579-580.
- Jamal S., M. Iqbal y M. Athar (2006) Phytotoxic effect of aluminum and chromium on the germination and early growth of wheat (*Triticum aestivum*) varieties Anmol and Kiran. *International Journal of Environmental Science and technology*. 3 (4): 411-416.
- January M., T. Cutright, H. Van Keulen y R. Wei (2008) Hydroponic phytoremediation of Cd, Cr, Ni, As, and Fe: Can *Helianthus annuus* hyperaccumulate multiple heavy metals? *Chemosphere*. 70 (3): 531–537.
- Keary I., C. Thomas y E. Sheffield (2000) The effects of the herbicide Asulam on the gametophytes of *Pteridium aquilinum*, *Cryptogramma crispa* and *Dryopteris filix-mas*. *Annals of Botany*. 85: 47-51.
- Klapheck S. (1988) Homoglutathione: isolation, quantification and occurrence in legumes. *Physiologia plantarum*. 74:727-732.
- Kotas J. y Z. Stasicka (2000) Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environmental Pollution*. 107: 263-283.
- Krämer U. (2005). Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion in Biotechnology*. 16:133–141.

La Crónica (2008) Sábado 13 de Diciembre. Retiran tierra contaminada con cromo en Tultitlán. Fuente:

http://www.cronica.com.mx/notaImprimir.php?id_notas=403667.

La Jornada (2002) Sábado 23 de noviembre. Cromatos, el tercer foco de contaminación química del país. Fuente:

<http://www.jornada.unam.mx/2002/11/23/032n1est.php?origen=estados.html>.

Madafiglio K., T. Manning, C. Murdoch, M. Tulip, M. Cooper, T. Hambley y H. Freeman (1990) Three chromium (III) complex with aminoacids ligands: (L-cysteinato)-(L.histidinato) chromium (III) 1-5hydrate and bis(DL-histidinato)chromium (III) chloride 4-2 hydrate. Acta Chrystallografy. C46: 554-561.

Martínez A. (2009) Acumulación de cromo en *Ricinus communis* L. y *Reseda luteola* L. Tesis de licenciatura, UNAM, México D.F. 66 pp.

Martínez M., D. Barrado, M. Zubillaga, A. Hager, T. De Paoli y J. Boccio (2006) Conceptos actuales del metabolismo del glutati6n: Utilizaci6n de los is6topos estables para la evaluaci6n de su homeostasis. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 40 (1): 45-51.

May M., T. Vernoux, C. Leaver, M. Van Montagu y D. Inzé (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. Journal of Experimental Botany. 49 (321) 649–667.

Meharg A. (2005) Mechanisms of plant resistance to metal and metalloid ions and potential biotechnological applications. Plant and Soil. 274:163–174.

Memon A., D. Aktoprakligül, A. Zdemür y A. Vertii (2001) Heavy metal accumulation and detoxification mechanisms in plants. Turkey Journal of Botany. 25: 111-121.

Mengel, K., Kirkby, E.A., 1987. Principles of Plant Nutrition. fourth edn. Int. Potash Inst. Bem, Switzerland, pp. 687.

- Mertz W. (1969) Chromium Occurrence and function in biological systems. *Physiological Reviews*. 49 (2): 164-239.
- Mester P., J. Hodson, H. Freeman y C. Moore (1977) Tridentate coordination by the L-cysteine. Crystal and molecular structure of sodium bis(L-cysteinate) chromate (III) dehydrate. *Inorganic Chemistry*. 16: 1494-1498.
- Mickel J. y A. Smith (2004) *The Pteridophytes of Mexico*. The New York Botanical Garden. New York, USA.
- Mohanty M., M. Pattnaik, A. Mishra y H. Patra (2011) Bio-concentration of chromium-an in situ phytoremediation study at South Kaliapani chromite mining area of Orissa, India. *Environ Monit Assess*. 1-10 pp.
- Monferrán M., M. Pignata y D. Wunderlin (2012) Enhanced phytoextraction of chromium by the aquatic macrophyte *Potamogeton pusillus* in presence of copper. *Environmental Pollution*. 161: 15-22.
- Moran R. y R. Riba (1995) *Flora mesoamericana*. Volumen 1 "Psilotaceae a Salviniaceae". Universidad Nacional Autónoma de México-Missouri Botanical Garden-The Natural History Museum (London). Mexico 470 pp.
- Morel J., G. Echevarria y N. Goncharova (2002) *Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils*. Springer. Trest, Czech Republic. 345 pp.
- Muñiz-Díaz de León M., B. Pérez-García, J. Márquez-Guzmán y A. Mendoza-Ruiz (2008) Developmental gametophyte morphology of seven species of *Thelypteris* subg. *Cyclosorus* (Thelypteridaceae). *Micron*. 39: 1351–1362.
- Murashige T. y F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*. 15: 473- 497.
- Navar V., E. Fernandez y S. Del Amo (1987) Allelopathic effects of green fronds of *Pteridium aquilinum* on cultivated plants, weeds, phytopathogenic fungi and bacteria. *Agriculture, Ecosystem and Environment*. 18 (3): 357-379.

- Panda S. y S. Choudhury (2005) Chromium stress in plants. *Brazilian Journal Plant Physiology*. 17(1): 95-12.
- Pearson, Ralph G. (1963). *Hard and Soft Acids and Bases*. *Journal of American Chemical Society*. 85 (22): 3533–3539.
- Pickering I. L. Gymaelius, H. Harris, R. Prince, G. Hirsch, Banks J. D. Salt y G. George. (2006) Localizing the Biochemical Transformations of Arsenate in a Hyperaccumulating Fern. *Environmental science and technology*. 40 (16): 5010-5014.
- Quaggiotti S., G. Barcaccia, M. Schiavon, S. Nicolé, G. Galla, V. Rossignolo, M. Soattin y M. Malagoli (2007) Phytoremediation of chromium using *Salix* species: Cloning ESTs and candidate genes involved in the Cr response. *Gene*. 402: 68–80.
- Raskin I. y B. Ensley (2000) *Phytoremediation of toxic metals: Using plant to clean up the environment*. John Wiley and Sons, INC. New York, USA.
- Raskin I., N. Kumar, S. Dushenkov y D. Salt (1994) Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 5:285-290.
- Rausser W. E. (1995) Phytoquelatins and related peptides. *Plant Physiology*. 109:1141-1149.
- Raven P., R. Evert y S. Eichhorn (2005) *Biology of plants*. Septima edición. W.H. Freeman and Company. 686 pp.
- Reeves RD, Baker AJM. (2000) Metal-accumulating plants. In: Raskin I, Ensley BD, editors. *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. New York: John Wiley & Sons Inc, 2000:193-229
- Rennenberg, H. 1984. The fate of excess sulfur in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol*. 35:121-153.

- Rennenberg, H., J. Sekija, L.G. Wilson, P. Filner. 1982. Evidence for an intracellular sulfur cycle in cucumber leaves. *Planta* 154:516-524.
- Riege D. y Del Moral R. (2004) Differential Tree Colonization of Old Fields in a Temperate Rain Forest. *The American Midland Naturalist*. 151 (2):251–264.
- Sarma H. (2011) Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. *Journal of environmental science and technology*. 4(2)118-138.
- Schiavona M., M. Pittarello, E. Pilon-Smitsb, M. Wirtzc, R. Hellc y M. Malagolia (2012) Selenate and molybdate alter sulfate transport and assimilation in *Brassica juncea* L. Czern.: Implications for phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany*. 75: 41– 51.
- Schützendübel A. y A. Polle (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*. 53(372): 1351-1365.
- Seoáñez M. (1999) Contaminación del suelo: estudios, tratamiento y gestión. Ediciones MUDI-PRENSA. Distrito Federal, México. 352 pp.
- Shanker A., C. Cervantes, H. Loza-Tavera y S. Avuadainayagam (2005) Chromium toxicity in plants. *Environment International*. 31 (5): 739-753.
- Shen Z. y Y. Liu (1998) Progress in the study on the plants that hyperaccumulate heavy metal. *Plant Physiology Communications*. 34: 133–139.
- Su Y., F. Han, B. Maruthi Sridhar y D. Monts (2005) Phytotoxicity and the phytoaccumulation of trivalent and hexavalent chromium in brake fern. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24 (8): 2019–2026.
- Sun, Y., Q. Zhou y C. Diao (2008) Effects of cadmium and arsenic on growth and metal accumulation. *Bioresource of Technology*. 99 (5): 1103-1110.

- Taras M., A. Greenberg, R. Hoak y M. Rand (1971) Estándar methods for examination of wáter and wastewater. Tercera edición. American Public Health Association. New York. 155-159.
- Tinklin R. y D. Bowling (1969) The Water Relations of Bracken: A Preliminary Study. *The Journal of Ecology*. 57 (3): 669-671.
- Tittle F. (1987) Auxin-stimulated ethylene production in fern gametophytes and sporophytes. *Physiology Plantarum*. 70: 499-502.
- USEPA (2000) Introduction to Phytoremediation. EPA., Washington, DC.
- Vaiopoulou E. y P. Gikas (2012) Effects of chromium on activated sludge and on the performance of wastewater treatment plants: A review. *Water research*. 46: 549 –570.
- Vakili B., F. Karimi, M. Sharifi y M. Behmanesh (2012) Chromium-induced tropane alkaloid production and H6H gene expresión in *Atropa belladonna* L. (Solanaceae) in vitro-propagated plantlets. *Plant Physiology and Biochemistry*. 52: 98-103.
- Vatamaniuk O., E. Bucher, J. Ward y P. Rea (2002) Worms take the ‘phyto’ out of ‘phytochelatins’. *Trends in Biotechnology*. 20 (2): 61-64.
- Vernay P., C. Gauthier-Moussard, L. Jean, B.Francois, O. Faure, G. Ledoigt y A. Hitmi (2008). Effect of chromium species on phytochemical and physiological parameters in *Datura innoxia*. *Chemosphere*. 72 (5): 763–771.
- Volke T. y J. Velasco (2002) Tecnologías para la remediación de suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología, México D.F. 62 pp.
- Watrud L, S. Maggard, T. Shiroyama, C. Coleman, M. Johnson, K. Donegan, G. Di Giovanni, L. Porteous y E. Lee (2003) Bracken (*Pteridium aquilinum* L.) frond biomass and rhizosphere microbial community characteristics are correlated to edaphic factors. *Plant and Soil*. 249 (2): 359-371.

- Xiang C. y Oliver D. (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 10: 1539-1550.
- Yadav S. (2010) Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*. 76: 167–179.
- Yu X., J. Gu y L. Xing (2008) Differences in uptake and translocation of hexavalent and trivalent chromium by two species of willows. *Ecotoxicology*. 17:747–755.
- Zabludowska E., J. Kowalska, L. Jedynak, S. Wojas, A. Sklodowska y D. Antosiewicz (2009) Search for a plant for phytoremediation – What can we learn from field and hydroponic studies? *Chemosphere*. 77: 301–307.
- Zhu Y., E. Pilon-Smits, L. Jouanin y N. Terry (1999) Overexpression of Glutathione Synthetase in Indian Mustard Enhances Cadmium Accumulation and Tolerance. *Plant Physiology*. 119: 73–79.

15 Anexos

15.1 Anexo 1. Medio de cultivo ½ MS.

Clasificación	Compuesto	mg/l	
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	
Micronutrientes	Na ₂ EDTA	18.65	
	MnSO ₄ H ₂ O	8.45	
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	4.3	
	H ₃ BO ₃	6.2	
	KI	0.41	
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.00012	
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.000012	
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.000012	
	Compuestos orgánicos	Tiamina	0.05
		Ac. Nicotínico	2.5
Piridoxina		2.5	
Myo-inositol		50	
Glicina		1	
Sacarosa		15000	
Agar	9000		

pH 5.7.

15.2 Anexo 2. Solución hidropónica.

Clasificación	Compuesto	mg/l
Macronutrientes	$(\text{NH}_4)\text{NO}_3$	825
	KNO_3	950
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	185
	KH_2PO_4	87.5
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	220
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	13.9
	Na_2EDTA	18.65

pH 5.7.