



**UNIVERSIDAD MICHOACÁN DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

División de Estudios de Posgrado

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental

**EFFECTO PROTECTOR DE LA MICORRIZA ARBUSCULAR EN
PLANTAS DE MAÍZ (*Zea mays* L.) EXPUESTA A Cr (VI) COMO
ALTERNATIVA DE BIORREMEDIACIÓN**

TESIS

PRESENTA

IDC. NANCY ROSITA ROJAS JACUINDE

PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL

DIRECTOR DE TESIS
DRA. YAZMÍN CARREÓN ABUD



MCIA
Maestría en Ciencias
en Ingeniería Ambiental
UMSNH

Morelia, Michoacán

Marzo 2018

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL **LABORATORIO DE GENÉTICA Y MICROBIOLOGÍA** DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA **DRA. YAZMÍN CARREÓN ABUD** Y COLABORACION DE LA TECNICO ACADEMICO M.C. MA. DE LOS ÁNGELES BELTRÁN NAMBO, CONTANDO CON EL APOYO FINANCIERO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mis padres Ma. Eduviges Jacuinde Chávez y Rafael Rojas Mercado por apoyarme en todo momento durante toda mi vida y darme la fuerza necesaria para culminar este proyecto personal. Gracias por todos los grandes esfuerzos y palabras de aliento que han logrado impulsar mi motivación y ganas de seguir adelante a pesar de las adversidades

A mi asesora de tesis la Dra. Yazmín Carreón Abud, le agradezco por todos los conocimientos compartidos, la paciencia que tuvo hacia mí y su apoyo incondicional en todo momento para el desarrollo de este proyecto.

A la mesa de sinodales Dr. Javier Villegas Moreno, Dr. Miguel Trujillo, Dra. Nabanita Dasgupta Shubert y M.C. Abril Munro Rojas; por su valioso tiempo que compartieron conmigo y sus sabios consejos. Fue una gran experiencia el haber colaborado con tan grandes personas y profesionistas, quienes me transmitieron su conocimiento y su gran amor por la investigación.

A la M.C Ángeles Beltrán Nambo, por su valiosa ayuda en el laboratorio, por compartir sus conocimientos, por las valiosas sugerencias para el buen desarrollo de este trabajo, por la paciencia que tuvo hacia mí y por su apoyo incondicional que trascendió hasta convertirse en una grandiosa amistad.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Mónica, Aarón, Fátima, Kari, Juana, Sandra, Alejandro, Hilda; con quien compartí agradables momentos, me ayudaron en resolución de dudas y problemas, me transmitieron sus conocimientos y siempre me brindaron palabras de aliento.

A mis hermanos Sandra y Rafael, por siempre creer en mí, apoyarme todos los días y alentarme a ser mejor persona.

¡GRACIAS!

Dedicatorias

A quienes me dieron el regalo más hermoso de toda mi vida MIS PADRES; a mis abuelos María Dolores Mercado†, Álvaro Rojas†, Salvador Jacuinde† y Anita Chávez†; quien en vida me dieron amor y me ensañaron que cuando uno se propone las cosas lo puede lograr, y que ahora desde el cielo guían mi camino y me dan la fortaleza para seguir adelante. Hasta el cielo para ustedes!

A quienes les debo todo, mis padres, Rafael Rojas Mercado y María Eduviges Jacuinde Chávez; por quererme incondicionalmente a pesar de mis errores, por enseñarme que todas las cosas son posibles cuando uno se lo propone, por inculcar en mí la perseverancia, humildad y responsabilidad; por ser mi gran ejemplo de vida. Para ustedes que me han cuidado y amado, que me han apoyado en cada una de mis decisiones y que me han demostrado que el amor de padres es el amor más puro y sincero que hay en la vida. Los amo!

Con quien he compartido toda mi vida, mis Hermanos Sandra y Rafael; quienes me han acompañado en los mejores y peores momentos, quienes están ahí cuando más los necesito y me han enseñado que su apoyo es incondicional, que han creído en mí para realizar cada una de las metas que me propongo y que están a mi lado para ayudarme y darme palabras de aliento cuando ya no puedo más. Para ellos!

A quien hace mis días más alegres mi sobrino Paul.

TABLA DE CONTENIDO

Índice de Tablas.....	7
Índice de Figuras.....	8
RESUMEN.....	10
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. MARCO TEÓRICO.....	13
2.1 METALES PESADOS.....	13
2.2 PROCEDENCIA DE LOS METALES PESADOS EN LOS SUELOS.....	13
2.2.1 Origen natural.....	15
2.2.2 Origen antropogénico.....	15
2.3 SUELO.....	16
2.4 MOVILIDAD DE LOS METALES PESADOS EN EL SUELO.....	19
2.4.1 Biodisponibilidad.....	21
2.5 CROMO.....	23
2.5.1 Cromo y su movilidad.....	23
2.5.2 Efectos tóxicos del cromo en plantas.....	25
2.6 REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS.....	27
2.7 CONTRIBUCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN LA REMEDIACIÓN DE SUELOS.....	29
2.7.1 Simbiosis micorrícica.....	30
2.7.2 Fisiología de la simbiosis y tolerancia a metales Pesados.....	30
2.8 MAÍZ (Zea mays L.).....	34
III. ANTECEDENTES.....	36
IV. JUSTIFICACIÓN.....	37
V. HIPOTESIS.....	38
VI. OBJETIVOS.....	39
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	39
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	39
VII. MATERIALES Y METODOS.....	40
7.1 FASE 1. PROPAGACIÓN DE INÓCULOS.....	40
7.1.1 Material vegetal.....	40
7.1.2 Germinación de semillas.....	40
7.1.3 Cultivo en macetas trampas.....	40
7.1.4 Porcentaje de colonización.....	42
7.2 FASE 2. EFECTO PROTECTOR DE LOS HMA EN PLANTAS DE MAÍZ.....	44
7.2.1 Prueba de germinación.....	44
7.2.1.1 Material Vegetal.....	44
7.2.1.2 Desinfección de la Semilla.....	44
7.2.1.3 Germinación de semillas.....	44
7.2.2 Suelo.....	45

7.2.2.1 Características del suelo.....	46
7.2.2.2 Estructura del Suelo.....	47
7.2.3 CRECIMIENTO DE PLANTAS DE MAÍZ (<i>Zea mays L.</i>) EN SUELO CON CROMO.....	48
7.2.3.1 Trasplante.....	48
7.2.3.2 Adición de Cromo.....	49
7.3 FASE 3. EFECTO DE LOS HMA EN LA ABSORCIÓN DE ELEMENTOS EN BIOMASA VETEGAL.....	49
VIII. RESULTADOS.....	51
8.1 FASE 1. PROPAGACIÓN DE INÓCULOS.....	51
8.2 FASE 2. EFECTO PROTECTOR DE LOS HMA EN PLANTAS DE MAÍZ.....	51
8.2.1 Estructura del suelo.....	54
8.2.2 Crecimiento de plantas de maíz (<i>Zea mays l.</i>) en suelo con cromo.....	56
8.2.2.1 Efecto del Cr (VI) en la Colonización Micorrícica de los HMA en plantas de Maíz (<i>Zea mays L.</i>).....	65
8.2.2.2 Efecto de la inoculación de HMA en la Biomasa fresca y seca de plantas de maíz sometidas a difenrentes concentraciones de Cr (VI).....	67
8.3 EFECTO DE LOS HMA EN LA ABSORCIÓN DE ELEMENTOS EN BIOMASA VEGETAL.....	68
8.3.1 Cuantificación de Nitrógeno y Fósforo.....	68
8.3.2 Cuantificación de Cromo.....	69
IX. DISCUSION.....	72
X. LITERATURA CITADA.....	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Rangos de concentraciones típicas de metales traza en los tipos de rocas más abundantes (mgK^{-1}).....	14
Tabla 2. Descripción de los componentes del Suelo.....	17
Tabla 3. Descripción de las propiedades físicas, químicas y biológicas como Indicadores de calidad, utilizados en sistemas agrícolas y forestales.....	19
Tabla 4. Formas químicas de los metales en el suelo y su disponibilidad relativa para las plantas.....	22
Tabla 5. Análisis Físico y químicos del suelo de Tiripetío.....	46
Tabla 6. Diagrama del diseño experimental.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Origen y principales fuentes de procedencia de metales pesados en el suelo.....	16
Figura 2. Porcentaje de los componentes del suelo.....	16
Figura 3. Dinámica de los metales pesados en el suelo.....	21
Figura 4. Ciclo oxido-reducción del cromo en suelos.....	24
Figura 5. Modelo hipotético de transporte y toxicidad de Cromo en raíces.....	26
Figura 6. Mecanismos involucrados en la Fitorremediación.....	28
Figura 7. Mecanismo de detoxificación de Metales Pesados en plantas.....	29
Figura 8. Estructura general de Hongo micorrízica arbuscular.....	30
Figura 9. Simbiosis micorrízica.....	31
Figura 10. Mecanismo de detoxificación de MP en plantas y hongos en la simbiosis micorrízica arbuscular.....	34
Figura 11. Diseño experimental general de la fase de propagación de los inóculos.....	41
Figura 12. Técnica de tinción con azul de Tripano para la determinación del porcentaje de colonización.....	43
Figura 13. Diagrama general de la metodología para la prueba de germinación.....	45
Figura 14. Ubicación del sitio donde se recolecto el suelo para el estudio.....	45
Figura 15. Fertilidad y cationes intercambiables del suelo de Tiripetío.....	46
Figura 16. Diagrama general de metodología para determinar la estructura del suelo proveniente de Tiripetío, Michoacán.	47
Figura 17. Estructuras básicas que forman los Hongos Micorrízicos Arbusculares.....	51
Figura 18. Representación de raíces colonizadas con HMA.....	52
Figura 19. Porcentajes de colonización total obtenidos en la colecta de las especies repropagadas.....	53
Figura 20. Porcentajes de colonización por estructuras.....	54
Figura 21. Porcentaje del suelo recuperado de cada tamiz.....	55
Figura 22. Porcentaje de supervivencia en plantas de maíz (<i>Zea mays L.</i>).	56
Figura 23. Altura de plantas de maíz (<i>Zea mays L.</i>), antes de la aplicación del Cromo hexavalente.....	57
Figura 24. Efecto de la inoculación de HMA en la Altura de plantas de maíz (<i>Zea mays L.</i>) expuesta a diferentes concentraciones de Cr. A) Plantas a 0 μ M, B) Plantas a 250 μ M, C) Plantas a 500 μ M y D) Plantas a 1000 μ M.....	59
Figura 25. Plantas de Maíz (<i>Zea mays L.</i>) al mes del trasplante, antes de la aplicación de Cromo.....	60

Figura 26. Efecto de clorosis en plantas de Maíz, sometidas a las diferentes concentraciones de Cr. A) Control a 1000 μ M B) Nativo a 500 μ M.....	60
Figura 27. Plantas de Maíz (<i>Zea mays L.</i>) después del primer mes de la aplicación de Cr....	61
Figura 28. Efecto de la inoculación de HMA sobre el tamaño de la raíz en plantas de Maíz (<i>Zea mays L.</i>) expuestas a Cr (VI). A) Plantas a 0 μ M, B) Plantas a 250 μ M, C) Plantas a 500 μ M y D) Plantas a 1000 μ M.....	62
Figura 29. Efecto del Cromo (VI) en el crecimiento de raíces.....	64
Figura 30. Comparación de variables Agronómicas (Diámetro de tallo y Ancho de Hojas) de plantas de maíz (<i>Zea mays L.</i>) expuesta a Cr (VI).	65
Figura 31. Porcentaje de colonización en plantas de Maíz (<i>Zea mays L.</i>) expuestas a diferentes concentraciones de Cr (VI).	66
Figura 32. Porcentaje de colonización por estructura en plantas de Maíz (<i>Zea mays</i>) expuestas a diferentes concentraciones de Cr (VI). A) Hifas, B) Arbúsculos, C) Vesículas y D) Micelio Externo.....	66
Figura 33. Porcentaje de colonización de otros Hongos en plantas de Maíz (<i>Zea mays L.</i>) expuestas a diferentes concentraciones de Cr (VI).....	67
Figura 34. Peso Fresco y seco en plantas de Maíz (<i>Zea mays L.</i>) expuestas a diferentes concentraciones de Cr (VI). A) Peso fresco parte aérea, B) Peso fresco raíz, C) Peso seco parte aérea y D) Peso seco raíz.....	68
Figura 35. Concentración de Nitrógeno y Fósforo en plantas de maíz expuestas a diferentes concentraciones de Cr (VI). (N-aéreo= Nitrógeno en parte aérea, N-raíz=Nitrógeno en parte raíz, P-aérea= Fosforo en parte aérea, P-raíz= Fosforo en parte raíz).....	69
Figura 36. Comparación general de concentraciones de Cr (VI) en plantas de maíz (<i>Zea mays L.</i>).....	70
Figura 37. Concentración de Cromo en plantas de maíz (<i>Zea mays L.</i>). Letras diferentes indican diferencias significativas.....	71

RESUMEN

El cromo (Cr) es el séptimo metal más abundante en la corteza terrestre, la mayoría de los suelos contienen cantidades significativas de Cromo (Cr) que varía de 100 a 300 $\mu\text{g/g}$, pero su disponibilidad para las plantas es limitada. La peligrosidad de los Metales Pesados (MP) es mayor al no ser química ni biológicamente degradables y su concentración en los seres vivos aumenta a medida que son ingeridos por otros a través de las cadenas tróficas. El Cr no es un elemento esencial para las plantas, los animales o para los seres humanos, por lo que a concentraciones elevadas de este MP causa diferentes síntomas de toxicidad y debido a su frecuente uso industrial, ha llegado a ser un agente contaminante para los diferentes agroecosistemas. Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) se asocian con la mayoría de las plantas angiospermas y les confieren efectos benéficos en la absorción de algunos nutrientes. La contaminación por metales pesados es uno de los principales estreses ambientales que afectan el metabolismo de las plantas, se ha reportado que en algunos casos los HMA pueden conferirle mayor tolerancia a las plantas ante la presencia de metales pesados. En este trabajo se determinó el efecto que tienen los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en la protección de plantas de Maíz (*Zea mays* L.) en suelos suplementados con diferentes concentraciones de Cr: 0 μM , 250 μM , 500 μM y 1000 μM , se utilizaron cuatro inóculos de HMA: a) *Rhizophagus irregularis* MUCL; b) *Gigaspora gigantea*; c) Inoculo de suelo nativo y d) Inoculo de suelo contaminado con cromo. Se evaluó la supervivencia, colonización micorrízica, tamaño y peso seco de la parte aérea, tamaño y peso seco de la raíz, además del efecto de toxicidad en el crecimiento de raíz, tallo y hojas y la cuantificación de Cr se realizó en Espectro de Absorción Atómica de Pekín Elmer. Los resultados mostraron que solamente algunos inóculos de HMA le confieren protección a las plantas de maíz. Se obtuvieron las mayores concentraciones de Cromo en las plantas con *G. gigantea* (50, 90 y 120 ppm). Además por efecto del cromo se observó disminución del crecimiento de las plantas, en donde la mínima longitud de 50 cm fue a 1000 μM .

Palabras Claves: Fitorremediación, Cromo, Maíz, Micorríza, Absorción.

ABSTRACT

Chromium (Cr) is the seventh most abundant metal in the earth's crust, most soils contain significant amounts of Cr, its concentration varies from 100-300 $\mu\text{g/g}$, but their availability for the plants is limited. The dangerousness of heavy Metals (MP) is greater by not being chemical or biologically degradable and its concentration in living beings increases as they are ingested by others through trophic chains. Cr is not an essential element for plants, animals and humans. High concentrations of Cr in humans causes different symptoms of toxicity; due to its frequent industrial use, it has become a pollutant for different agroecosystems. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are associated with most angiosperms and provide them with beneficial effects on the absorption of some nutrients. Heavy metal pollution is the main environmental stress that affects the metabolism of the plant, it has been reported that in some cases the AMF can confer greater tolerance to plants in the presence of heavy metals. In this study we determined the effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on the protection of maize plants in soils supplemented with different concentrations of Cr 0 μM , 250 μM , 500 μM y 1000 μM , four inoculum AMF were used a) *Rhizophagus irregularis* MUCL; b) *Gigaspora gigantea*; inoculum of agricultural soils of maize and inoculum of Chromium-contaminated soils. Mycorrhizal colonization, the size and dry weight of shoots, the size and dry weight of roots, and survival, were assessed, also the effect of toxicity thereof in the growth of root, stem and leaf evaluated, the quantification of Cr was carried out in the Atomic Absorption Spectrometry of Peking Elmer. The results showed that only some AMF inoculum provide protection to maize plants. The highest concentrations of Chromium were obtained in plants with *G. gigantean* (50, 90 and 120 ppm). In addition, due to the effect of chromium, a decrease in plant growth was observed, where the minimum length of 50 cm was 1000 μM .

I. INTRODUCCIÓN

Los metales pesados han sido utilizados en muchas actividades, como la agricultura, la minería, la fundición, la galvanoplastia y el refinado del oro. Por lo tanto, se han documentado serios problemas asociados a la contaminación de los suelos en estas actividades. La acumulación de metales pesados en las plantas inhibe algunos procesos enzimáticos que afectan su productividad tanto cualitativa como cuantitativamente.

En México, al igual que en muchos países, la prevención de la contaminación del ambiente (suelo, agua y aire) y su recuperación es una prioridad. La Biotecnología del suelo nace como una rama trascendental dentro de la ciencia del suelo, y los resultados muestran el enorme potencial de los microorganismos del suelo en la intervención en el crecimiento y en la protección de las plantas frente a diferentes factores, así como en la degradación e inmovilización de contaminantes. Como resultado, se incrementa el interés de los investigadores por la aplicación de los microorganismos en diferentes áreas.

Los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) son microorganismos del suelo que establecen una simbiosis mutualista con la mayoría de las plantas superiores, proporcionando un enlace físico directo entre el suelo y las raíces de las plantas; les confieren efectos benéficos en la absorción de algunos nutrientes, particularmente fósforo. Son un factor importante para su adaptación en suelos contaminados (Bastida *et al*, 2009).

Dentro de los métodos biológicos de recuperación de suelos contaminados por metales pesados, metaloides y otros contaminantes, el uso de plantas y microorganismos rizosféricos representa una alternativa de bajo costo y con enormes ventajas ambientales (González-Chávez, 2005). Los microorganismos del suelo juegan un papel clave en la movilización e inmovilización de los cationes de los metales, así como en los cambios de su disponibilidad para las plantas (Bastida *et al*, 2009). Además, se ha reportado que en algunos casos los HMA pueden conferirle mayor tolerancia a las plantas ante la presencia de metales pesados. A pesar de que los HMA son considerados importantes en la toma de nutrientes inmóviles, ellos también juegan un papel en la reducción de toma de metales pesados (Carreón-Abud *et al*, 2013).

II. MARCO TEÓRICO

2.1 METALES PESADOS

Los metales pesados son aquellos elementos químicos que presentan una densidad igual o superior a 5 g/cm^3 cuando están en forma elemental o cuyo número atómico es superior a 20 (Delgadillo-López *et al.*, 2011). Los metales pesados constituyen un grupo de 65 elementos con características físicas, químicas y biológicas muy heterogéneas. Desde el punto de vista biológico, se distinguen dos grandes grupos, aquellos que tienen la consideración de oligoelementos o micronutrientes y los que no presentan una función biológica conocida. Los últimos su presencia puede ser tóxica; mientras que los esenciales son requeridos por todos los organismos en cantidades trazas, (Bastida García y Sánchez Reyes, 2009) estos elementos constituyen un grupo de gran importancia, ya que son esenciales para las células, se requieren en pequeñas cantidades por las plantas y animales; todos ellos son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital pero superado un cierto umbral se vuelven tóxicos. (Spain, 2003) Dentro de los oligoelementos o micronutriente se encuentra el Cobalto (Co), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Molibdeno (Mo), Manganeso (Mn), Níquel (Ni), Hierro (Fe) y Zinc (Zn), entre otros (Negretti, 1995).

Los elementos pertenecientes a estos dos grupos también varían según autores. Además, cuando se habla de metales pesados tampoco se especifica el estado del elemento, es decir, si se trata del elemento puro, o de algunos o la totalidad de sus diversos estados de oxidación (compuestos), que no presentan las mismas propiedades físicas, químicas y tóxicas. Este aspecto complica todavía más su clasificación. Por ejemplo, algunos compuestos de cromo hexavalente (Cr VI) son citados como carcinógenos humanos, pero prácticamente no se encuentra información sobre cánceres ocasionados por exposición a ese metal puro. Además, el cromo y algunas de sus aleaciones se emplean sin problemas, desde hace tiempo, en prótesis médicas y dentales.

2.2 PROCEDENCIA DE LOS METALES PESADOS EN LOS SUELOS

Los metales pesados son componentes habituales de muchos suelos pues su procedencia está relacionada con la composición del material original. Para un adecuado equilibrio del ecosistema, el contenido de metales pesados en suelos, debe ser únicamente en función de la

composición del material original y de los procesos edafogénicos que en él tienen lugar; sin embargo, la actividad humana ha incrementado el contenido de estos metales en el suelo en cantidades considerables, siendo esta, sin duda, la causa más frecuente de las concentraciones tóxicas (González-Chávez, 2005). Al contenido natural de elementos químicos existentes en un suelo se le llama fondo geoquímico local (FG) o nivel de fondo (Ross, 1994) y representa una situación ideal que se debe conocer para determinar la contaminación por la presencia de cantidades de metales inusualmente elevadas (Gough, 1993). Existe una diferencia en cuanto a los niveles de metales pesados que se encuentran en las distintas rocas presentes en el suelo; estos diferentes valores ponen como manifiesto la amplia variabilidad existente (Adriano, 1986, Ross, 1994).

	<i>Rocas Ígneas</i>			<i>Rocas Sedimentarias</i>		
	Ultrabásica	Básicas	Granitos	Caliza	Arenisca	Esquisto
Cd	0.12	0.13-0.2	0.09-0.2	0.028-0.1	0.05	0.2
Co	110-150	35-50	1	0.1-4	0.3	19-20
Cr	2000-2980	200	4	10-11	35	90-100
Cu	10-42	90-100	10-13	5.5-15	30	39-50
Hg	0.004	0.01-0.08	0.08	0.05-0.16	0.03-0.029	0.18-0.5
Mn	1040-1300	1500-2200	400-500	620-1100	4-60	850
Ni	2000	150	0.5	7-12	2-9	68-70
Pb	0.1-14	3-5	20-24	5.7-7	8-10	20-23
Sn	0.5	1-1.5	3-3.5	0.5-4	0.5	4-6
Zn	50-58	100	40-52	20-25	16-30	100-120

Tabla 1. Rangos de concentraciones típicas de metales traza en los tipos de rocas más abundantes (mgK^{-1}) (Roos 1994)

Las fuentes de origen de los metales pesados pueden clasificarse en naturales y antropogénicas.

2.2.1 ORIGEN NATURAL

Los metales pesados son componentes naturales de la corteza terrestre. En condiciones normales los procesos geoquímicos que originan las rocas determinan su contenido en metales pesados. Rocas básicas y ultramáficas, solidificadas en primer lugar a partir del magma, incorporan metales pesados como el Co, Ni, Zn y Cr. En cambio, las rocas ácidas, las últimas en solidificar, tienden a enriquecerse en Pb (Navarro-Aviñó *et al*, 2007).

2.2.2 ORIGEN ANTROPOGÉNICO

Las fuentes antrópicas se pueden clasificar en puntuales (fijas) y no puntuales (móviles), dependiendo de su procedencia (Bautista Zuñiga, 1999). Las actividades humanas han ejercido un efecto considerable en la concentración y movilidad de los metales en suelos.

Las actividades humanas de mayor impacto.

- Aplicación de productos químicos agrícolas y lodos residuales. Los metales pesados son frecuentemente usados por su toxicidad como componentes de fungicidas, pesticidas o desinfectantes. Los lodos residuales tienen un alto contenido de metales pesados, entre los que cabe destacar Cd, Pb y Hg (Negretti, 1995).
- Actividades de minería y fundición, que incluyen la extracción, el procesado preliminar, la evacuación de los residuos y el transporte de los productos semiprosados. Estas operaciones pueden producir una contaminación localizada de metales in situ o ex situ. En los suelos afectados por la minería, presentan concentraciones elevadas, principalmente, de Cu, Ni, As, Se, Fe y Cd (Wang y Chen, 2009).
- Generación de electricidad y otras actividades industriales. La combustión de carbón es una de las principales fuentes de deposición de metales en suelos. Los metales asociados con áreas altamente industrializadas, pueden aportar As, Cd, Cr, Fe, Ni, Pb, Zn y Hg a los suelos.
- Residuos domésticos. Aproximadamente el 10% de la basura está compuesta de metales. También es el caso de uso de sprays ricos en Cu o conservantes de la madera ricos en As, Cu y Cr (Bautista, 1999).
-

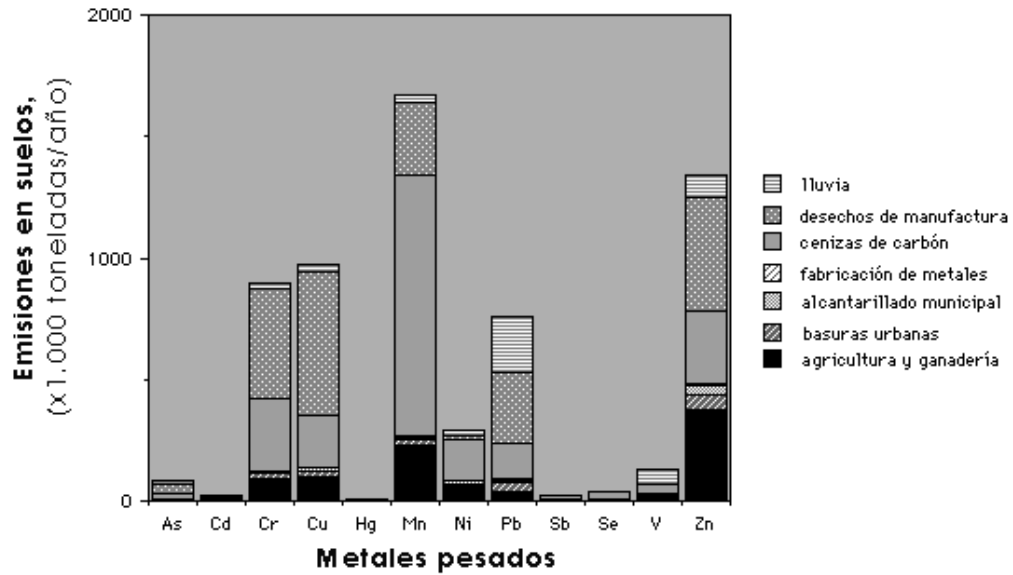


Fig. 1. Origen y principales fuentes de procedencia de metales pesados en el suelo (Bautista, 1999).

2.3 SUELO

El suelo puede definirse, de acuerdo con el glosario de la Sociedad Americana de la Ciencia del Suelo (1984), como el material mineral no consolidado en la superficie de la tierra, que ha estado sometido a la influencia de factores geológicos y ambientales (material parental, clima, macro y microorganismos y topografía), actuando durante un determinado periodo. El suelo constan de cuatro grandes componentes: materia mineral, materia orgánica, agua y aire (Fig. 2) (Epstein y Bloom, 2005).

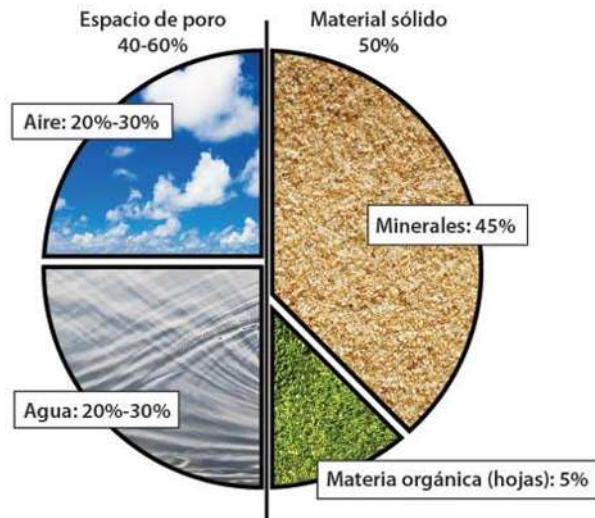


Fig. 2. Porcentaje de los componentes del suelo (Epstein y Bloom, 2005)

En la siguiente tabla se describe los diferentes componentes del suelo.

<i>Componente</i>	<i>Descripción</i>
Constituyentes Minerales (inorgánicos)	Están compuestos de pequeños fragmentos de roca y minerales de varias clases. Las cuatro clases más importantes de partículas inorgánicas son: grava, arena, limo y arcilla.
Materia Orgánica	Residuo vegetal o animal y su descomposición lo transforma en materiales importantes en la composición del suelo y en la producción de plantas. La materia orgánica bruta es descompuesta por microorganismos y transformada en materia adecuada para el crecimiento de las plantas y que se conoce como humus.
Agua	El agua es retenida dentro de los poros con grados variables de intensidad. Es esencial para abastecer de nutrimentos a las plantas.
Aire	El aire del suelo no es continuo y está localizado en los poros separados por los sólidos.

Tabla 2. Descripción de los componentes del Suelo (Garcías et al, 2003)

El suelo es un componente esencial del ambiente en el que se desarrolla la vida y es el medio primario para la nutrición mineral de las plantas terrestres; es vulnerable, de difícil y de larga recuperación (tarda desde miles a cientos de miles de años en formarse), y de extensión limitada, por lo que se considera un recurso natural no renovable. El suelo es el hábitat de una biota específica de microorganismos y pequeños animales que constituyen el edafón. Este recurso se utiliza para fines muy diversos: agricultura, ganadería, pastos y montes, extracción de minerales y de materiales para la construcción, soporte para las edificaciones, eliminación de residuos y actividades de ocio y recreo, entre otros. En este sentido, puede decirse que el suelo provee importantes funciones ambientales, dentro de las cuales se destaca ser el sustento de alimento para las plantas, almacenar nutrientes, poseer y albergar materia orgánica proveniente de restos animales y vegetales, ser el hábitat de diversos organismos que transforman la materia orgánica presente en él, entre otros factores que lo hacen ser esencial en el desarrollo de los ecosistemas de los cuales forma parte (Dorronsoro, 2007).

Doran y Parkin (1994) y autores posteriores, desarrollaron un listado de propiedades básicas del suelo utilizadas como un indicador de la calidad (Tabla 3); la mayor parte de los procesos biogeoquímicos interactúan directamente con el suelo y sus elementos e integran las

propiedades físicas, químicas, biológicas y bioquímicas de los diferentes procesos. Estas propiedades son sensibles a diferentes condiciones de manejo y al clima, y se pueden encontrar en bases de datos existentes (García *et al*, 2003).

Indicadores de Calidad	Descripción e influencia en el estado del suelo
FÍSICOS	
<i>Textura</i>	Proporción de componentes inorgánicos de diferentes formas y tamaños como arena, limo y arcilla. Influye como factor de fertilidad y en la habilidad de retener agua, aireación, drenaje, contenido de materia orgánica e intercambio de oxígeno.
<i>Profundidad del suelo</i>	Aumento de los recursos (agua, oxígeno y nutrientes) disponibles para las plantas por unidad de área.
<i>Densidad del Suelo</i>	Peso por volumen del suelo, controla el porcentaje de compactación del suelo. Afecta a propiedades y procesos que influyen en el agua y suministro de oxígeno, productividad y erosión.
<i>Porosidad</i>	Porcentaje del volumen del suelo no ocupado por sólidos (50%). Dentro del espacio poroso se pueden distinguir macro poros y micro poros donde agua, nutrientes, aire y gases pueden circular o retenerse.
<i>Capacidad de retención de agua</i>	Relaciona la retención del agua, transporte y erosión: agua disponible.
<i>Estructura del Suelo</i>	Partículas texturales del suelo como arena, limo y arcilla se asocian para formar agregados y a unidades de mayor tamaño nombrados por peds. La estructura del suelo afecta directamente la aireación, el movimiento del agua en el suelo, la conducción térmica, el crecimiento radicular y la resistencia a la erosión.
<i>Color</i>	Depende de los componentes y varía con el contenido de humedad, materia orgánica presente y grado de oxidación de minerales presentes. Se usa para distinguir las secuencias en un perfil del suelo, determinar el origen de materia parental, presencia de materia orgánica, estado de drenaje y la presencia de sales y carbonato.
QUÍMICOS	
<i>Materia Orgánica</i>	Papel fundamental en la estabilidad de agregados; porosidad, reacción con oxígeno intercambiable, agua disponible, reserva en el ciclo del carbono y reposición de nutrientes.
<i>pH</i>	Determina el grado de adsorción de iones (H ⁺) por las partículas del suelo e indica si un suelo está ácido o alcalino. Es el indicador principal en la disponibilidad de nutrientes para las plantas, influyendo en la solubilidad, movilidad, disponibilidad y de otros constituyentes y contaminantes inorgánicos presentes en el suelo.
<i>Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)</i>	La Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) es una medida de cantidad de cargas negativas presentes en las superficies de los minerales y componentes orgánicos del suelo (arcilla, materia orgánica o sustancias húmicas) y representa la cantidad de cationes que las superficies pueden retener (Ca, Mg, Na, K, NH ₄ etc.). Estos

	serán intercambiados por otros cationes o iones de hidrogeno presentes en la solución del suelo y liberados por las raíces. El nivel de CIC indica la habilidad de suelos a retener cationes, disponibilidad y cantidad de nutrientes a la planta, su pH potencial entre otras.
<i>Nutrientes para las Plantas</i>	La cantidad de nutrientes presente en el suelo determina su potencial para alimentar organismos vivos. Los nutrientes esenciales para el desarrollo y crecimiento de las plantas se suelen clasificar entre macro y micro nutrientes dependiendo de su requerimiento para el desarrollo de las plantas.
BIOLÓGICOS	
<i>Biomasa microbiana</i>	Potencial catalítico microbiano y reposición de carbono y nitrógeno.
<i>N potencialmente mineralizable</i>	El Ciclo del nitrógeno del suelo se relaciona con la actividad microbiana y fauna del suelo como las lombrices, nematodos, protozoarios, hongos, bacterias y artrópodos. Productividad del suelo y N disponible.
<i>Actividad enzimática</i>	Informan del cambio de calidad en los suelos debido a actividad antrópica

Tabla 3. Descripción de las propiedades físicas, químicas y biológicas como Indicadores de calidad, utilizados en sistemas agrícolas y forestales. (Doran y Parkin, 1994, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura FOA).

2.4 MOVILIDAD DE LOS METALES PESADOS EN EL SUELO

Los metales pesados son tóxicos como cationes, puesto que inhiben la acción de varias enzimas biológicamente importantes, además estos pueden adherirse firmemente al suelo y solamente una pequeña cantidad puede disolverse en agua pasando así a los niveles más profundos del suelo contaminando las aguas subterráneas (Pinzón *et al*, 1995). La contaminación del suelo por metales pesados está fundamentalmente relacionada con diferentes tipos de actividades humanas. Una vez en el suelo, los metales pesados pueden quedar retenidos en el mismo pero también pueden ser movilizados en la solución del suelo mediante diferentes mecanismos biológicos y químicos (González-Chávez, 2005).

En el suelo los metales pesados pueden estar en seis compartimentos principales, asociados de formas diversas a los constituyentes del suelo, (Wang y Chen, 2009).

- Dentro de las redes cristalinas de los minerales primarios (no alterados, heredado de la roca madre) y de constituyentes secundarios (minerales).
- Secuestrados o ligados a los restos vegetales y animales (que son liberado a medida que se van mineralizando estos residuos).
- Incluidos en las macromoléculas orgánicas
- En forma intercambiable (ion) asociados a la superficie de las arcillas minerales y a la materia orgánica.
- En forma soluble, coloide o partículas, en la solución del suelo.

Los factores que influyen en la movilización de metales pesados en el suelo son (Wang y Chen, 2009):

- Características del suelo: pH, potencial redox, composición iónica de la solución del suelo, capacidad de cambio, presencia de carbonatos, materia orgánica, textura.
- Naturaleza de la contaminación: origen de los metales y forma de deposición.
- Condiciones ambientales: acidificación, cambios en las condiciones redox, variación de temperatura y humedad.

En general, los metales pesados incorporados al suelo pueden seguir cuatro diferentes vías (García y Dorronsoro, 2005).

- Quedar retenidos en el suelo, ya sea disueltos en la solución o bien fijados por procesos de adsorción, complejación y precipitación.
- Pueden ser absorbidos por las plantas y así, incorporarse a las cadenas tróficas
- Pasar a la atmósfera por volatilización
- Movilizarse a las aguas superficiales o subterráneas

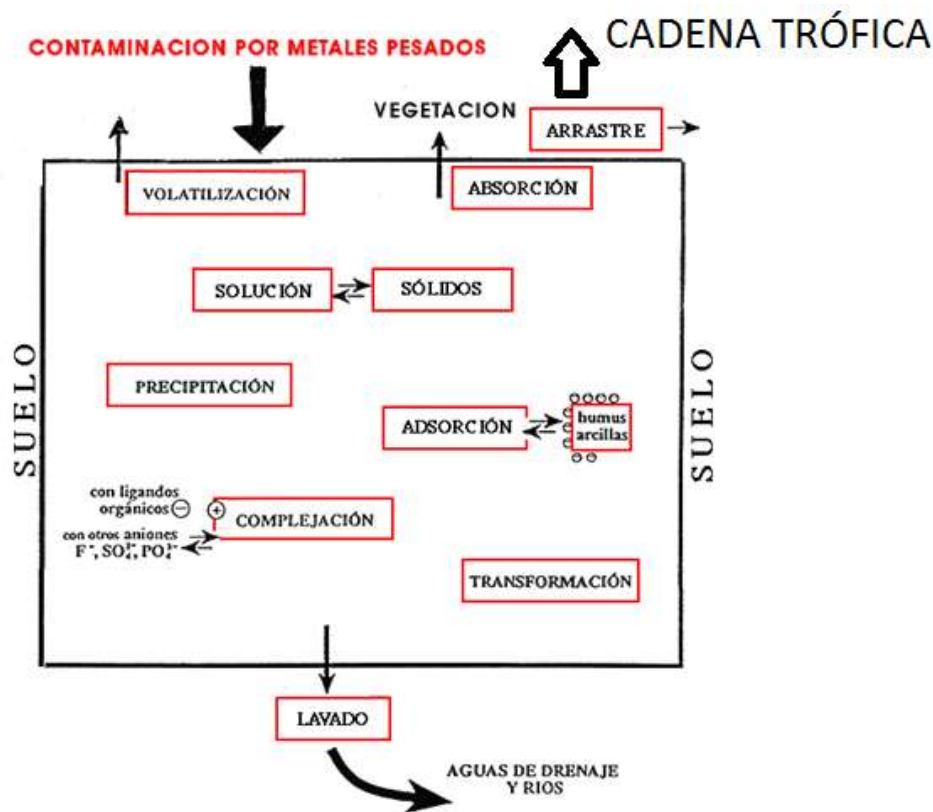


Fig. 3. Dinámica de los metales pesados en el suelo. (Modificado de García y Dorronsoro, 2005.)

Los procesos que gobiernan la compartimentalización de metales en los suelos se traducen en reacciones de adsorción-desorción y precipitación-disolución, que afectan directamente al reparto de metales entre la fase sólida y acuosa, así como reacciones de complejación y oxidación-reducción que afectan a la reactividad del propio metal (solubilidad y biodisponibilidad) (Navas y Lindhorfer, 2003).

2.4.1 BIODISPONIBILIDAD

La toxicidad de los metales depende no sólo de su concentración, sino también de su movilidad y reactividad con otros componentes del ecosistema. Para que los metales pesados puedan ejercer su toxicidad sobre un ser vivo, éstos deben encontrarse disponibles para ser captados por éste, es decir que el metal debe estar biodisponible. El concepto de biodisponibilidad se encuentra íntimamente relacionado con las condiciones fisicoquímicas del ambiente, que determinan la especiación y por lo tanto la concentración de metal libre. Se define el término biodisponibilidad como la capacidad de un elemento para pasar de un

compartimento cualquiera del suelo a un ser vivo (García y Dorronsoro, 2005). Esta movilidad, está determinada por la forma, el número de cargas y la energía de retención de los metales pesados y se ve influenciada por factores externos (pH, temperatura, humedad, ambiente químico, etc.). Aunque también se puede asociar con el uso del suelo, por ejemplo, los metales en suelos forestales son más fácilmente movilizados que en suelos agrícolas, lo que está directamente relacionado con mayor acidez del suelo y a la mayor presencia de sustancias orgánicas de bajo peso molecular. Por ello es fundamental al determinar el grado de contaminación por metales pesados de un ambiente, conocer su biodisponibilidad, es decir, la concentración de metal libre y lábil presente en la muestra (Bautista, 1999).

La especiación y la localización de contaminantes en el suelo están relacionados con su forma química en el momento de la incorporación, debido a que va a regular no sólo su disponibilidad (según se encuentre disuelto, adsorbido, ligado o precipitado) sino que también el grado de toxicidad (García y Dorronsoro, 2005) e influirá decisivamente en el efecto contaminante producido. Por tanto, la biodisponibilidad de contaminantes depende de sus propiedades químicas, las propiedades del suelo, las condiciones ambientales y la actividad biológica (Navarro-Aviñó, *et al.*, 2007).

Como se expresó anteriormente los metales pesados son retenidos en el suelo de distinta forma y a su vez dichas formas de retención representan diferentes grados de disponibilidad relativa para las plantas (Tabla 4).

<i>Formas de retención en el suelo</i>	<i>Disponibilidad relativa</i>
Ion en la disolución del suelo	Fácilmente disponibles
Ion en complejo de intercambio orgánico o inorgánico	Disponible
Metales complejados o quelatados por compuestos orgánicos	Menos disponibles
Metal precipitado o coprecipitado	Disponible solo si ocurre una alteración química
Incorporación en la matriz biológica	Disponibles de la descomposición
Metal en la estructura mineral	Disponibles después de la alteración mineral

Tabla 4. Formas químicas de los metales en el suelo y su disponibilidad relativa para las plantas.

2.5 CROMO

El cromo se encuentra en la naturaleza en tres formas estables: como cromo metálico, Cr (III) y Cr (VI), es el vigésimo primer elemento más abundante de la corteza terrestre, con una concentración promedio de 100 mg/kg.

Los usos del Cr y sus compuestos en la industria son muy diversos, del 60 al 70% se utiliza en aleaciones, incluyendo al acero inoxidable y el 15% es utilizado en procesos químicos industriales, principalmente en el curtido de pieles, en pigmentos y galvanoplastia. Estas actividades incrementan su concentración en el ambiente, por lo que se ha convertido en un contaminante importante del aire, suelo y agua (Armienta, 1995).

El Cromo (III) es un elemento esencial para organismos que puede interferir en el metabolismo del azúcar, cuando la dosis es muy baja. El Cromo (VI) es la forma comercial más importante debido a sus propiedades químicas es mayoritariamente tóxico para los organismos. (Zayed y Terry, 2003). El Cr (VI) se encuentra como iones cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), los cuales atraviesan fácilmente las membranas plasmáticas al ser capturados erróneamente por el sistema de transporte de sulfato. En el ambiente, el Cr (VI) puede ser reducido a Cr (III), ya sea de manera abiótica o mediante enzimas llamadas cromato reductasas. El estudio de estas enzimas ha adquirido gran interés por su posible uso en la biorremediación de la contaminación por cromato (Ramírez-Díaz *et al*, 2009)

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) ha colocado al Cr (VI) en la posición cuatro de la lista de sustancias clasificadas según su potencial carcinógeno. El Cr (VI) es tóxico para la mayoría de los organismos. Sus compuestos son corrosivos y la exposición a ellos provoca, independientemente de la dosis, rápidas reacciones alérgicas en la piel. La exposición a corto plazo a altos niveles puede producir úlceras en la piel expuesta, perforaciones de las superficies respiratorias e irritación del conducto gastrointestinal.

2.5.1 CROMO Y SU MOVILIDAD

El Cromo una vez depositado en el suelo su mayor parte se encuentra en forma soluble, formando precipitados o adsorbido a la fracción sólida de los suelos y sedimentos (Moreno, 2003). La oxidación de Cr (III) a Cr (VI) puede darse por diferentes agentes en el suelo, especialmente por el manganeso, mientras que las reacciones de reducción de Cr(VI) a Cr(III)

principalmente por los compuestos de carbono. Estas reacciones son termodinámicamente espontáneas y tanto la oxidación como la reducción pueden llevarse a cabo en un mismo suelo (Bartlett y James, 1979).

En los suelos el Cromo está presente principalmente en la forma $\text{Cr}(\text{OH})_3$ (productos de la hidrólisis de $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$) o como $\text{Cr}(\text{III})$ adsorbido a los componentes del suelo. Esto controla su lixiviación hasta los cuerpos de agua y su toma por parte de las plantas. Los iones CrO_4^{2-} y HCrO_4^- son las formas más móviles de $\text{Cr}(\text{VI})$ en el suelo, siendo el HCrO_4^- la forma dominante en suelos ácidos con $\text{pH} < 6$. Estas especies pueden ser tomadas por las plantas o fácilmente lixiviadas, a través del perfil del suelo, hasta los cuerpos de agua a tal punto de contaminarlas (Calder, 1988 y Handa, 1988).

En la figura 4 se observa que las formas móviles de cromo (VI) pueden ser reducidas por diferentes compuestos orgánicos y catalizada por especies como el $\text{Fe}(\text{II})$ o S^{2-} , mientras que, la oxidación $\text{Cr}(\text{III})$ puede ser realizada sólo con la mediación de ácidos fulvicos o citratos, este proceso de oxidación sucede principalmente por el manganeso (III, IV) el cual queda en su forma divalente para ser fácilmente oxidado por oxígeno, con el fin de producir nuevamente MnO_2 .

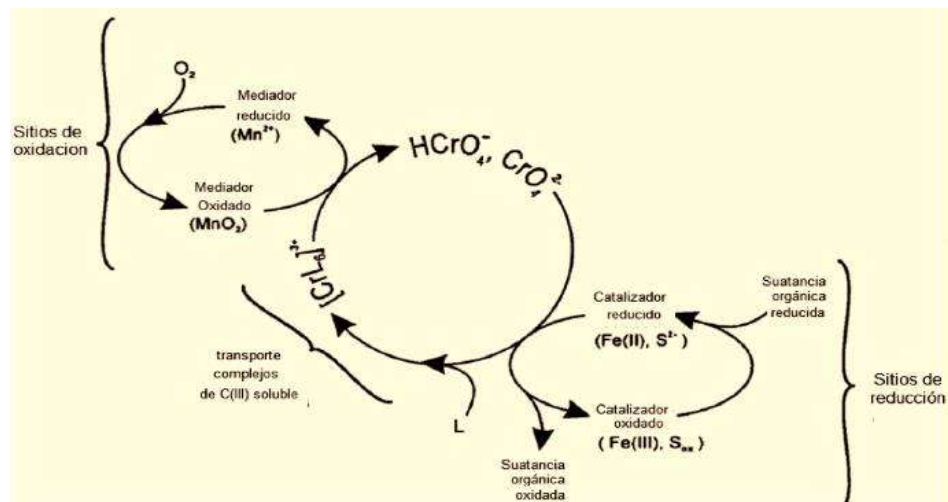


Fig. 4. Ciclo oxido-reducción del cromo en suelos. Tomada de James y Bartlett (1988) y James (1996).

En general, se considera que la movilidad de los metales pesados es muy baja, estos quedan acumulados en los primeros centímetros del suelo (aproximadamente 40 cm) y pueden ser

lixiviados a los horizontes inferiores en muy pequeñas cantidades. La presencia de altas concentraciones en el horizonte superficial seguida de un decremento notable a los pocos centímetros de profundidad es un indicador para el diagnóstico de contaminación por causas antropogénicas; esto provoca que en la biota edáfica y en las plantas, existan cambios tanto en su morfológicos, en su bioquímica, en las actividades enzimáticas y en la reproducción (Cicerone *et al*, 2006)

Las cantidades totales presentes en un suelo constituyen una medida poco representativa de la posible toxicidad de un metal pesado, por lo que debe conocerse la forma química bajo la que se presenta, la especiación, pues la toxicidad de un elemento es muy distinta dependiendo de ésta, que va a regular no sólo su disponibilidad (según se encuentre disuelto, adsorbido, ligado o precipitado) sino que también el grado de toxicidad que presente va a depender de la forma química en sí misma (Cicerone *et al*, 2006).

La movilidad del cromo es muy limitada y depende del contenido de arcillas del terreno y, en menor medida, de la presencia de óxido de hierro, Fe₂O₃, y materia orgánica. El cromo puede adsorberse irreversiblemente a la matriz de suelos, de forma totalmente no disponible para animales o plantas. En medios reductores, como los provocados por la inundación de los terrenos y la descomposición de materia vegetal, el cromo (II) puede formar complejos, lo que aumenta su solubilidad y movilidad (Sotelo-Muñoz, 2012).

2.5.2 EFECTOS TÓXICOS DEL CROMO EN PLANTAS

Los componentes del cromo son altamente tóxicos a las plantas y son perjudiciales sobre su crecimiento y desarrollo. Aunque algunos cultivos no son afectados a bajas concentraciones de Cr ($3.8 \times 10^{-4} \mu\text{M}$) (Huffman y Allaway, 1973), el Cr es tóxico en muchas plantas superiores a $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ en peso seco (Davies, *et al.*, 2002). En altas concentraciones, los MP interfieren con actividades enzimáticas esenciales por modificación de la estructura proteica o por el reemplazamiento de elementos vitales dando como resultado síntomas de deficiencia en la planta. La membrana plasmática es particularmente vulnerable a la toxicidad de MP, desde la permeabilidad de la membrana y de esta manera su funcionalidad puede ser afectada por la alteración de proteínas membranales intrínsecas como H⁺ -ATPasas (Hall, 2002). Como una consecuencia, se presentan en la planta los síntomas de toxicidad tales

como clorosis, retraso en el crecimiento, obscurecimiento en raíces, efectos en los dos fotosistemas, arresto en el ciclo celular y otros síntomas.

Los efectos tóxicos del Cr son primeramente dependientes de la especiación del metal, la cual determina su captación, translocación y acumulación (figura 5). La ruta de transporte del Cr (VI) es un mecanismo activo que involucra acarreadores de aniones esenciales tal como el sulfato (Cervantes, 2001). Se ha reportado que el hierro, azufre y fósforo, compiten con el Cr. El uso de inhibidores metabólicos disminuye la captación del Cr (VI), pero no afecta la captación de Cr (III), indicando que la captación de Cr (VI) depende de la energía metabólica y no la del Cr (III) (Wallace, 1976).

La mayor concentración del Cr se encuentra en las raíces y es menor en las estructuras aéreas vegetativas y reproductivas. La razón de la alta acumulación del Cr en las raíces es porque éste es inmovilizado en las vacuolas de las células de las raíces, haciéndolo menos tóxico. Desde que el Cr (VI) y el Cr (III) cruzan la endodermis vía simplasto, el Cr (VI), en las células se reduce a Cr (III), el cual es retenido en las células del córtex bajando las concentraciones de Cr (VI), lo que en parte podría explicar la baja toxicidad de Cr (III). Las enzimas que reducen el Cr (VI) han sido reportadas ampliamente en bacterias y hongos (Cervantes, 2001).

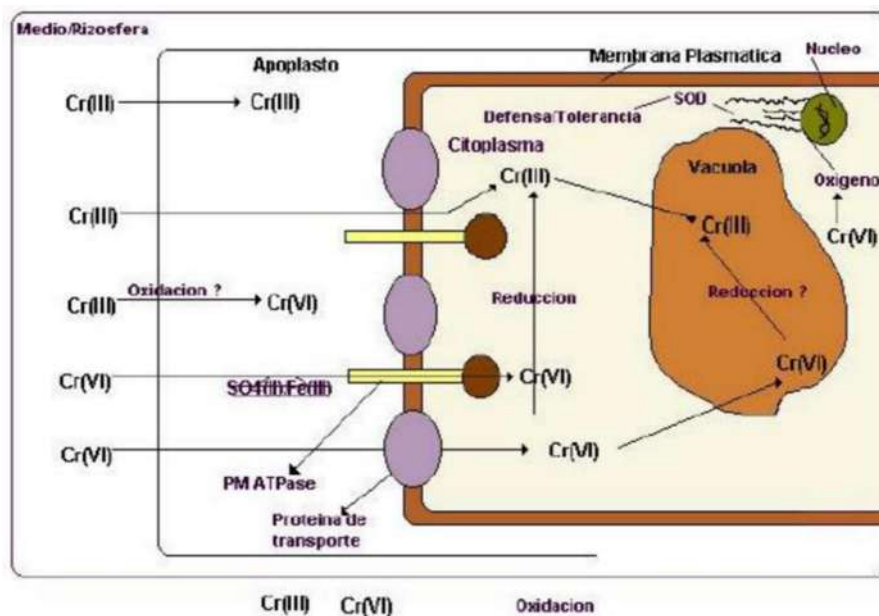


Fig. 5. Modelo hipotético de transporte y toxicidad de Cromo en raíces (Ortiz-Castro, 2005).

2.6 REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS

De los sistemas ambientales el suelo es el medio más estático, donde los contaminantes pueden permanecer durante mucho tiempo. Esta permanencia a largo plazo es especialmente grave en el caso de contaminantes inorgánicos. Su persistencia, acumulación progresiva y/o su transferencia a otros sistemas supone una amenaza para la salud humana y la de los ecosistemas. (Becerril *et al*, 2007) La contaminación constituye uno de los aspectos más importantes en la degradación de los suelos y la calidad; es decir, su capacidad para sostener efectivamente el crecimiento de las plantas y otros organismos, puede verse afectada negativamente por la contaminación (Maqueda, 2003). Los metales no se degradan, así que pueden acumularse en el ecosistema a través del tiempo provocando concentraciones elevadas y efectos adversos en la mayoría de los organismos; por ello, se han desarrollado técnicas para remediar los suelos contaminados de metales pesados.

La recuperación de suelos contaminados mediante métodos físicos o químicos normalmente es rápida pero de alto costo económico. Esta puede realizarse *in situ* (tratando el suelo en su lugar) o *ex situ* (tratamiento tras transporte del suelo). Las técnicas biológicas, o biorremediación, tienen como objetivo básico promover los procesos naturales y desarrollar técnicas para acelerar la recuperación de suelos y sedimentos contaminados. Dentro de las técnicas biológicas o ecológicas, el uso de plantas (Fitorremediación) se considera capaz de dar soluciones *in situ*, con un gasto financiero y tecnológico relativamente bajo. Además, el resultado, una cobertura “verde”, es más agradable estéticamente y más aceptable desde el punto de vista ambiental (Bernal *et al*, 2007).

La Fitorremediación es el uso de plantas para limpiar ambientes contaminados. Aunque se encuentra en desarrollo, constituye una estrategia muy interesante, debido a la capacidad que tienen algunas especies vegetales de absorber, acumular y/o tolerar altas concentraciones de contaminantes como metales pesados y compuestos orgánicos (Bastida *et al*, 2009).

Ventajas:

- Las plantas pueden ser utilizadas como entidades extractoras de bajo costo económico para depurar suelos y aguas contaminadas.
- Algunos procesos ocurren en forma más rápida con plantas que con microorganismos.

- Es un método apropiado para descontaminar superficies grandes o para finalizar la descontaminación de áreas restringidas en plazos largos.

Desventajas:

- El proceso se limita a la profundidad de penetración de las raíces o aguas poco profundas.
- Los tiempos del proceso pueden ser prolongados.

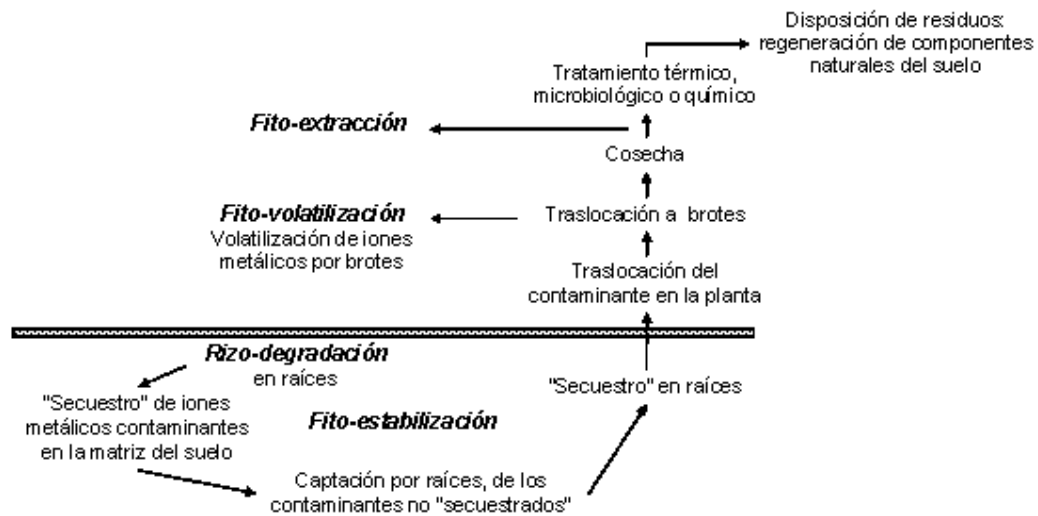


Fig. 6. Mecanismos involucrados en la Fitorremediación (INE, 2007)

Las plantas han desarrollado varios mecanismos para mantener la homeostasis para concentraciones elevadas de Metales Pesados (Hall, 2002) (Fig. 7). Los principios básicos de los mecanismos de detoxificación incluyen la quelación extracelular de los MP por los exudados de la raíz o por unión de los Metales Pesados en las paredes celulares de la rizodermis. Los sistemas activos de las plantas en el citosol controlan las concentraciones de los Metales Pesados por eflujo.

Intracelularmente la célula de la planta produce agentes quelantes tales como fitoquelatinas y metalotioneinas, las cuales tienen como propiedad una alta afinidad a la unión de los Metales Pesados. El complejo resultante puede finalmente ser exportado del citoplasma al tonoplasto y llegar a ser secuestrado dentro de la vacuola (Hall, 2002). Existen también dos estrategias principales que utilizan las plantas para unirse a los MP en el suelo

(fitoestabilización) o para importar y guardar los MP en los tejidos de la plantas (fitoextracción).

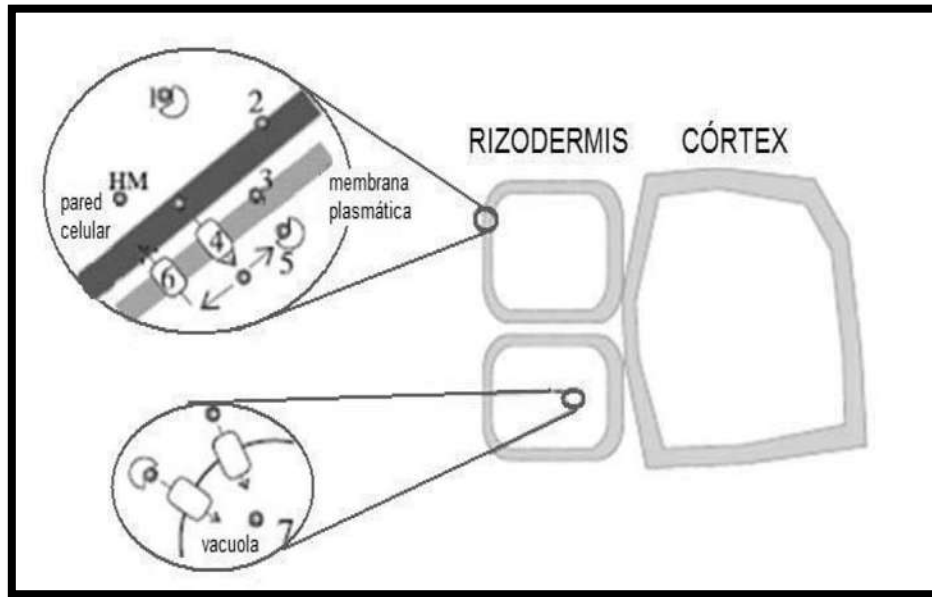


Fig.7. Mecanismo de detoxificación de Metales Pesados en plantas (Göhre y Paszkowski, 2006). 1) Agentes quelantes son secretados y se unen a los metales en el suelo. Ej. Histidina y ácidos orgánicos a partir de la planta. 2) Unión de los Metales Pesados a los componentes de la pared celular. 3) La membrana plasmática como una barrera viva y selectiva. 4) Transportadores de metales específicos y no específicos en la membrana plasmática. 5) Quelación en el citosol. Ej. Metalotioneínas. 6) Exportación vía específica o no específica o transporte pasivo de las células. 7) Secuestro de Metales Pesados en la vacuola de las células de plantas.

2.7 CONTRIBUCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN LA REMEDIACIÓN DE SUELOS

La capacidad de algunos seres vivos (algas, bacterias, hongos, levaduras) para acumular elementos metálicos ha sido observada desde el punto de vista toxicológico (Khan, 2001), sin embargo, las últimas investigaciones indican que algunos microorganismos pueden ligar iones metálicos a través de mecanismos fisicoquímicos (Wang y Chen, 2009). A pesar de que existe una gran variedad de materiales biológicos que pueden crear enlaces para retener iones metálicos, solamente aquellos cuya característica aparece en altas proporciones y mayor velocidad respecto al comportamiento y condiciones naturales, son seleccionados y considerado su uso, en diferentes ecosistemas (acuáticos y terrestres especialmente) (Wang y Chen, 2009).

En algunas especies de plantas cultivadas, la tolerancia a metales pesados a través del uso de micorrizas arbusculares (MA), constituye un ejemplo de bioacumulación y biosorción, incluyendo mecanismos de intercambio, formación de complejos, coordinación, adsorción, interacción electrostática, quelación y precipitación, actuando individual o simultáneamente (Bainard *et al*, 2011).

2.7.1 SIMBIOSIS MICORRÍCICA

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) se encuentran en el suelo en la mayoría de los ecosistemas, incluyendo suelos contaminados. La asociación más común que se presenta es la micorriza del tipo arbuscular, la cual forma simbiosis endotrófica con las raíces de Angiospermas, Gimnospermas, Pteridofitas y Talofitas (Guerrero *et al*, 1996).

El 80% de las plantas terrestres son capaces de formar micorrizas. Los efectos beneficiosos de las micorrizas arbusculares son bien conocidos, especialmente en la nutrición mineral de las plantas y en la protección contra agentes patógenos del suelo (Lovera *et al*, 2007).

2.7.2 FISIOLÓGÍA DE LA SIMBIOSIS Y TOLERANCIA A METALES PESADOS

La colonización de ecosistemas terrestres por parte de las plantas, se debe en gran parte a la asociación de estas con MA, siendo la colonización espacial, el beneficio al hospedero y la tolerancia ambiental (Powell *et al*, 2009).

La micorriza arbuscular es una simbiosis mutualista que está caracterizada por el movimiento de nutrimentos minerales adquiridos por el hongo hacia la planta y el flujo hacia el hongo de compuestos carbonados producidos por la planta (Varela *et al*, 2001).

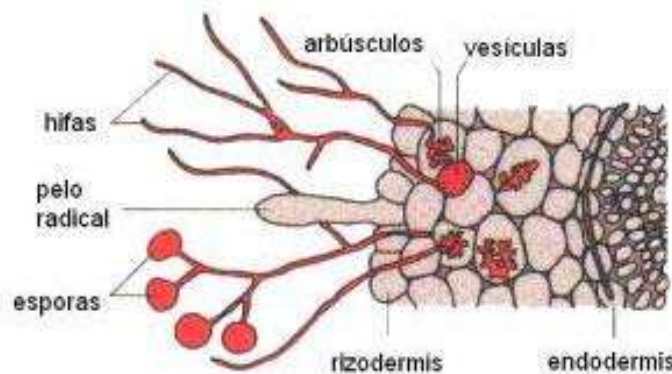


Fig.8. Estructura general de Hongo micorrícica arbuscular

Las estructuras más importantes de las MA, involucradas en la simbiosis y tolerancia metales pesados son los arbusculos, las vesículas y las hifas (Bainard *et al*, 2011). Los primeros, se originan a partir de la ramificación dicotómica repetida de una hifa al interior de una célula vegetal y hacen efectivo el intercambio de nutrientes (Guerrero, 1996). El hongo inicialmente crece en medio de las células corticales, pero rápidamente penetra en la pared celular de la célula hospedera, creciendo con ella. A medida que se da este crecimiento, la membrana celular de la célula hospedera sufre una invaginación que envuelve al hongo, creando un compartimiento apoplástico, allí se acumula material de alta complejidad molecular. Esta invaginación impide el contacto directo del citoplasma de la célula del hongo con el de la célula de la planta y permite una zona de intercambio de nutrientes, muy eficiente entre los simbiontes (Hamel y Plenchette , 2007).

Las vesículas, ensanchamientos terminales de las hifas, con forma ovoide, de pared delgada o gruesa, dentro y fuera de la raíz, acumulan reservas de carbono en forma de lípidos, se encuentran generalmente en espacios intercelulares pero también en espacios intracelulares. Su función principal es de almacenamiento, como compartimientos de los metales pesados (González-Chávez, 2005). Finalmente, las hifas, estructuras de colonización de las MA con características colonizadoras e infectivas (intraradicales) o exploradoras y de absorción de nutrientes (extraradicales) (Guerrero, 1996), emergen de la raíz y se extienden en el suelo varios centímetros, incluso metros, generando micelio externo como sistema de absorción de nutrientes y agua (Sylvia, 2005).

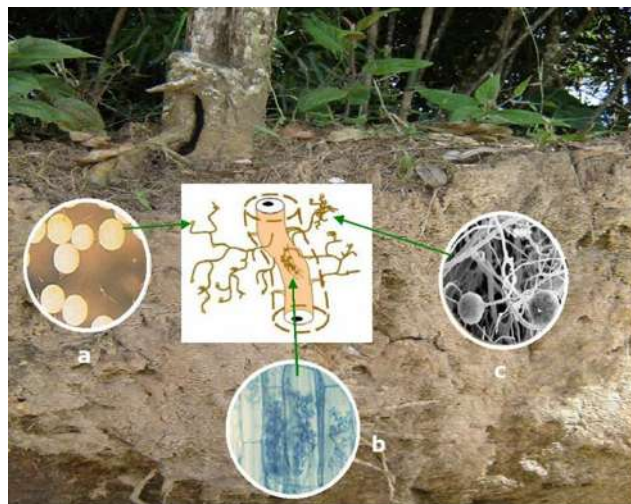


Fig. 9. Simbiosis micorrízica

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) ofrecen un atractivo mecanismo de fitorremediación, debido a que durante la interacción simbiótica, el sistema radical de las plantas micorrizadas se incrementa y con esto se aumenta el potencial para tomar los metales pesados. Algunos reportes muestran que la mayor concentración de metales pesados en plantas micorrizadas que crecen en suelos contaminados se encuentra en las raíces, funcionando la micorriza como un sistema fitoestabilizador. También se ha observado que la inoculación de plantas con HMA permite la acumulación de metales pesados en tallos y hojas (Dasgupta–Schubert *et al*, 2011). El transporte de Metales pesados a través de las hifas es favorecido por tratarse de organismos con hifas. Por otra parte, la posible existencia de transportadores en la membrana de los arbusculos que exportan metales pesados hacia la matriz interfacial (zona de contacto íntimo entre la membrana plasmática del hongo y la célula radical), permite una mayor incorporación de metales pesados por la planta. La glomalina, glicoproteína producida por las hifas de las micorrizas, ha mostrado su potencial al momento de establecer enlaces con moléculas de alta toxicidad como en el caso de los metales pesados, lo que constituye una barrera eficaz que acumula metales en la masa micelial sin permitir que ingresen a las células vegetales. (González-Guerrero, 2005)

Compuestos exudados por las raíces de las plantas, permiten el reconocimiento de la micorriza, estimulando la germinación de esporas, el crecimiento y ramificación de las hifas (Khan, 2001). Esto implica que la diversidad de las plantas y su edad (especialmente en cultivos perennes y semiperennes) desempeñan un papel importante en las comunidades de micorrizas en suelo, siendo remplazadas las especies de micorrizas según el estado fenológico del cultivo (Husband, 2002). Existen reportes de altos niveles de dependencia entre el pH del suelo y la abundancia y diversidad de comunidades de MA dependiendo del género, indicando la no generalización de su aplicación a lo largo y ancho del país. (Serralde, 2004)

Diferentes microorganismos son capaces de concentrar metales de manera activa y pasiva, en niveles que son substancialmente mayores a los del entorno que los rodea (Unz y Shuttleworth, 1996), razón por la cual, desde hace varias décadas existe un creciente interés por la interacción microorganismos-metales y sus posibles aplicaciones comerciales. La inmovilización de los metales pesados mediante procesos activos y pasivos se conoce con el

nombre de bioacumulación y biosorción respectivamente, e incluyen los mecanismos mencionados anteriormente (quelación, intercambio iónico y encapsulamiento).

Las MA han demostrado de manera repetitiva su capacidad como agente reductor del estrés causado en plantas debido a la contaminación por metales pesados en suelos (Regvar *et al*, 2007). El mecanismo básico de funcionamiento de esta tolerancia es la expresión de diferentes genes que codifican proteínas asociadas a variados mecanismos de transporte a nivel celular, que responden de manera diferente ante cada uno de los metales pesados. Esta expresión génica es observada en los genes del micelio intra y extrarradical de modo diferenciado, como respuesta inicial al daño causado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) siendo posiblemente el primer aporte de la simbiosis planta-hongo (Regvar *et al*, 2007). Se ha reportado que los metales pesados que alcanzan el interior de las raíces son depositados en el tejido del parénquima, donde la mayoría de las estructuras del hongo (hifas intrarradicales, arbusculos y vesículas) se encuentran alojadas (Bainard *et al*, 2011). Sin embargo la metodología asociada a los reportes consultados no permite la diferenciación del lugar de depósito de dichos metales (células vegetales o del hongo) (Regvar *et al*, 2007).

Debido a lo anterior se puede describir que la función de los HMA en suelos contaminado con metales pesados puede intervenir de distintas maneras (Fig. 10). Los Metales Pesados también son absorbidos por la vía de la hifa fungal y pueden ser transportados por la planta. De esta manera, en algunos casos las plantas micorrizadas pueden demostrar aumento en la toma de Metales Pesados y éstos pueden ser transportados de la raíz al tallo (fitoextracción), mientras que otros casos los HMA contribuyen a la inmovilización de los Metales Pesados dentro del suelo (fitoextracción). El resultado de la eficiencia de colonización micorrízica como descontaminante de suelos depende de la combinación de la planta/hongo/metal pesado y de su influencia en las condiciones del suelo (Gaur y Adholeya, 2004).

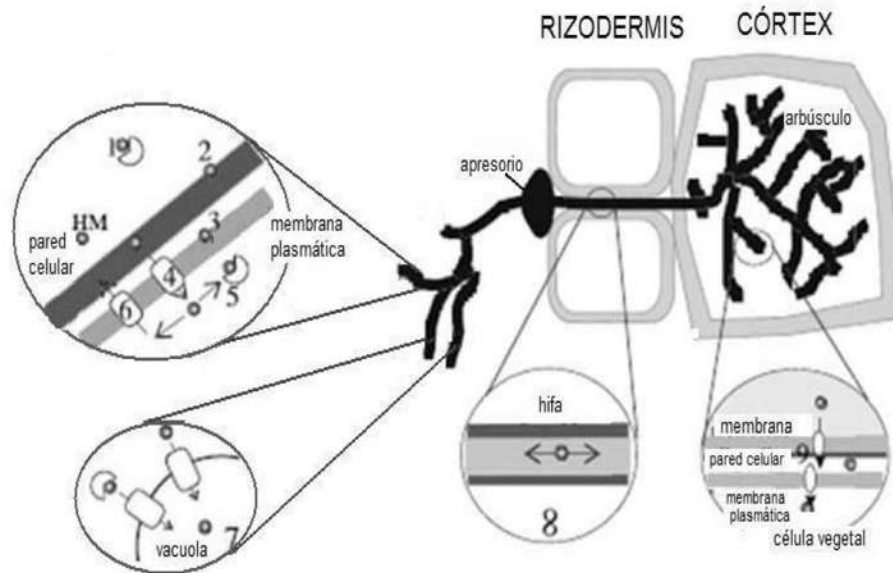


Fig. 10. Mecanismo de detoxificación de MP en plantas y hongos en la simbiosis micorrízica arbuscular. (Göhre y Paszkowski, 2006). 1) Agentes quelantes son secretados y se unen a los metales en el suelo. Ej. Glomalina a partir del hongo. 2) Unión de los Metales Pesados a los componentes de la pared celular de los hongos. 3) La membrana plasmática como una barrera viva y selectiva en hongos. 4) Transportadores de metales específicos y no específicos en la membrana plasmática de hongos (importe pasivo y activo). 5) Quelación en el citosol. Ej. Metalotioneinas (plantas y hongos), ácidos orgánicos aminoácidos, y chaperonas metalo específicas. 6) Exportación vía específica o no específica o transporte pasivo de las células de la planta al hongo. 7) Secuestro de Metales Pesados en la vacuola de las células de los hongos. 8) Transporte de Metales Pesados en la hifa del hongo. 9) En arbusculos, exportación del metal a partir del hongo para importarlo dentro de las células de la planta vía transporte activo y pasivo.

2.8 MAÍZ (*Zea mays L.*)

El maíz es un cultivo de gran importancia en el mundo, por su creciente demanda para consumo humano y animal (FAO, 2013).

El maíz es una especie monocotiledónea que pertenece a la familia Poaceae de gran valor comercial y cultural en Mesoamérica. Recientemente el maíz se ha establecido como un organismo modelo en la investigación básica para generar información sobre la biología de los cereales (Demostrables y Scanlon, 2009). La raíz del maíz al igual que en otras plantas, participa en la captación de agua y nutrientes del suelo, además provee soporte estructural y es el sitio de interacción con factores bióticos y abióticos que con frecuencia determinan la productividad del cultivo (Liedgens *et al*, 2000). El maíz es una planta de crecimiento rápido con una capacidad de adaptación, su elevado rendimiento y las posibilidades futuras de

mejora por vía genética hacen de esta planta uno de los cultivos de mayor importancia para la humanidad, por lo que puede ser útil para propósitos de fitorremediación.

El maíz es una planta anual con un gran desarrollo vegetativo, que puede alcanzar hasta los 5 m de altura (lo normal son 2 a 2,50 m). Muy robusta, su tallo es nudoso y macizo y lleva de 15 a 30 hojas alargadas y abrazadoras (4 a 10 cm de anchas por 35 a 50 cm de longitud), de borde áspero, finamente ciliado y algo ondulado (Demostrables y Scanlon, 2009).

III. ANTECEDENTES

Carreón-Abud, Beltrán-Nambo, & Martínez Trujillo en el 2013 determinaron el efecto que tienen los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la protección de plantas de jitomate en suelos suplementados con diferentes concentraciones de Cr: 1000 ppm (3,9 mM), 3000 ppm (10,2 mM) y 6000 ppm (20,4 mM). Se evaluó la supervivencia, colonización micorrízica, tamaño y peso seco de la parte aérea, tamaño y peso seco de la raíz. Los resultados mostraron que la presencia del Cr incrementa la colonización micorrízica, como una posible estrategia de la planta que contribuye a reducir los efectos nocivos del metal. La supervivencia de las plantas fue mayor en presencia de HMA en presencia de Cr a 6000 ppm. La inoculación con HMA tuvo un efecto protector en las plantas inoculadas con Cr, en el peso seco de la raíz y el tamaño de la parte aérea.

Cuevas Gabriela e Walter Ingrid en el 2003 estudiaron la absorción y la distribución de metales pesados (Cu, Zn, Ni, Cd, Pb y Cr) en plantas de maíz (*Zea mays* L.) cultivadas en un suelo calcáreo que fue enmendado con diferentes dosis de compost de lodo residual. También se analizaron los metales asimilables en el suelo extraídos con ácido dietilentriamino pentaacético (DTPA) con el fin de determinar el efecto residual y la movilidad de estos elementos en el suelo a lo largo del perfil. Los resultados obtenidos indicaron que la cantidad de metales pesados aportados por el compost no representó, en nuestras condiciones experimentales, ningún riesgo para el buen desarrollo del maíz y que los contenidos de estos en las diferentes partes de la planta no superaron el umbral de tolerancia que pudiera causar efectos tóxicos al ser consumidos por el ganado. La concentración de los metales asimilables en el suelo no mostró diferencias significativas entre los tratamientos con compost y estos no fueron diferentes significativamente con respecto al fertilizante mineral.

Ortiz-Cano, *et al.*, en 2009 evaluaron la capacidad extractora de Plomo (Pb) y Cadmio (Cd) del quelite (*Amaranthus hybridus* L.) al adicionar una mezcla de micorrizas arbusculares (*Entrophospora columbiana*, *Glomus intraradices*, *G. etunicatum*, *G. clarum*). Los resultados indican que la adición de micorrizas incrementó significativamente ($P < 0.05$) la concentración de Pb y Cd en raíz, tallo y hoja de quelite. Las concentraciones de estos metales se incrementaron significativamente conforme la edad de la planta.

IV. JUSTIFICACIÓN

En México se tiene un número considerable de sitios contaminados como resultado de actividades antropogénicas, que han provocado la acumulación de metales pesados en el suelo. El estudio de suelos contaminados por metales pesados se enfoca en su afectación que tienen sobre el desarrollo de las plantas, ya que se llegan a provocar daños contundentes en las cosechas de muchos cultivos importantes como el maíz, frijol, etc., causando drásticos deterioros en la economía de muchos países del mundo. Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) pueden ayudar a remediar suelos y proteger a las plantas. Existen una amplia variedad de estudios importantes sobre los hongos micorrícicos arbusculares, pero son pocos los que se enfocan en su desarrollo en ambientes contaminados.

El cromo en las plantas se conoce, entre otras, lesiones en el sistema radicular, originadas principalmente por el cromo (VI). No sólo las distintas especies sino también las distintas partes internas de las plantas difieren considerablemente en el modo de asimilar el cromo y en el tipo de lesiones que acusan. Los efectos tóxicos que el cromo ejerce sobre las plantas han sido descritos, fundamentalmente, en base a ensayos vasculares.

Es por ello que actualmente se retoma la importancia de dar soluciones sostenibles al problema de la contaminación de los suelos puesto que éste representa el sustento para el desarrollo de una amplia variedad de cultivos que dan alimento a una gran parte de la humanidad.

El comprender de mejor manera el desarrollo y el comportamiento de los hongos micorrícicos arbusculares y sus microorganismos asociados es sumamente importante ya que esto puede dar las herramientas necesarias para manipular de manera exitosa el efecto benéfico de estos microorganismos frente a condiciones de estrés por metales que impiden el desarrollo de las plantas de la zona contaminada, así como problemas críticos como la agricultura y sostenimientos de bosques.

De esta forma el principal objetivo de este trabajo es conocer el efecto de la asociación micorrízica arbuscular en la protección de plantas de maíz y su efecto en la captación de cromo, como una alternativa para la biorremediación.

V. HIPOTESIS

La asociación de plantas con hongos formadores de micorríza arbuscular, tienen un efecto protector en plantas de maíz (*Zea mays*) sometidas a diferentes concentraciones de Cromo en el suelo.

VI. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto protector de la asociación micorrízica arbuscular bajo diferentes concentraciones de Cromo, en plantas de maíz (*Zea mays*), y su efecto sobre la captación del metal por la planta.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el efecto de los hongos micorrícicos arbusculares en la protección de plantas de maíz, en suelos suplementados con diferentes concentraciones de Cromo.

Determinar el efecto de los hongos micorrícicos arbusculares en la captación de Cromo en las plantas de maíz.

VII. MATERIALES Y METODOS

7.1 FASE 1. PROPAGACIÓN DE INÓCULOS

7.1.1 MATERIAL VEGETAL.

Las semillas de Maíz (*Zea mays*) se esterilizó superficialmente mediante inmersión en una solución de cloro al 50% por 5 minutos con agitación constante y se sometieron posteriormente a cinco lavados con agua destilada estéril.

7.1.2 GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Las semillas fueron colocadas en cajas Petri con agua estéril durante dos semanas, posteriormente fueron trasladadas al invernadero y sembradas directamente en las macetas.

7.1.3 CULTIVO EN MACETAS TRAMPAS

Para el montaje de la propagación se utilizó el cultivo trampa con plantas de maíz. Se utilizaron macetas de 2 kilos las cuales se esterilizaron previamente con una suspensión de cloro comercial y agua al 70% durante 1 día. Para el sustrato se utilizó una mezcla de suelo y arena en proporción de 1:1 el cual fue esterilizado dos vez en autoclave a 120°C por 20 min y un tercera vez por 1 hora, esto se efectuó para el caso de la propagación de los inóculos de *Rhizophagus irregularis* MUCL y *Gigaspora gigantea*. Para la propagación del inoculo nativo de suelos de maíz, el suelo se recolecto de una parcela de maíz a una profundidad de entre 10-30 cm; ubicada en la comunidad de **Tzurumútaró** que se localiza en el Municipio Pátzcuaro del Estado de Michoacán. Para el inoculo de suelos contaminados con cromo se utilizó un suelo con una concentración de cromo de 100 µM, el cual fue utilizado en un experimento previo. En estos dos casos el suelo no fue esterilizado.

El sistema se mantuvo por 4 meses, regando una o dos veces por semana a capacidad de campo, dependiendo de las condiciones ambientales; se adicionó una solución nutritiva de Nitrato de amonio (NH₄NO₃) al segundo y tercer mes.

Pasado este tiempo se dejó de regar por tres semanas para propiciar el estrés de la planta y comience a esporular.

El diseño para esta primera fase de propagación de inóculos consistió en 10 macetas por inoculo, de las cuales se eligieron 5 macetas dependiendo de su características

(sobrevivencia, tamaño y vitalidad) para determinar el porcentaje de colonización, las cuales fueron denominadas como **R1, R2, R3, R4 y R5** para el caso de *Rhizophagus irregularis* MUCL; **G1, G2, G3, G4 y G5** para el inoculo de *Gigaspora gigantea*; **N1, N2, N3, N4 y N5** para el inoculo de suelo nativo y **Cr1, Cr2, Cr3, Cr4 y Cr5** para el caso del inoculo de suelo contaminado con Cromo.

Esquema de la metodología

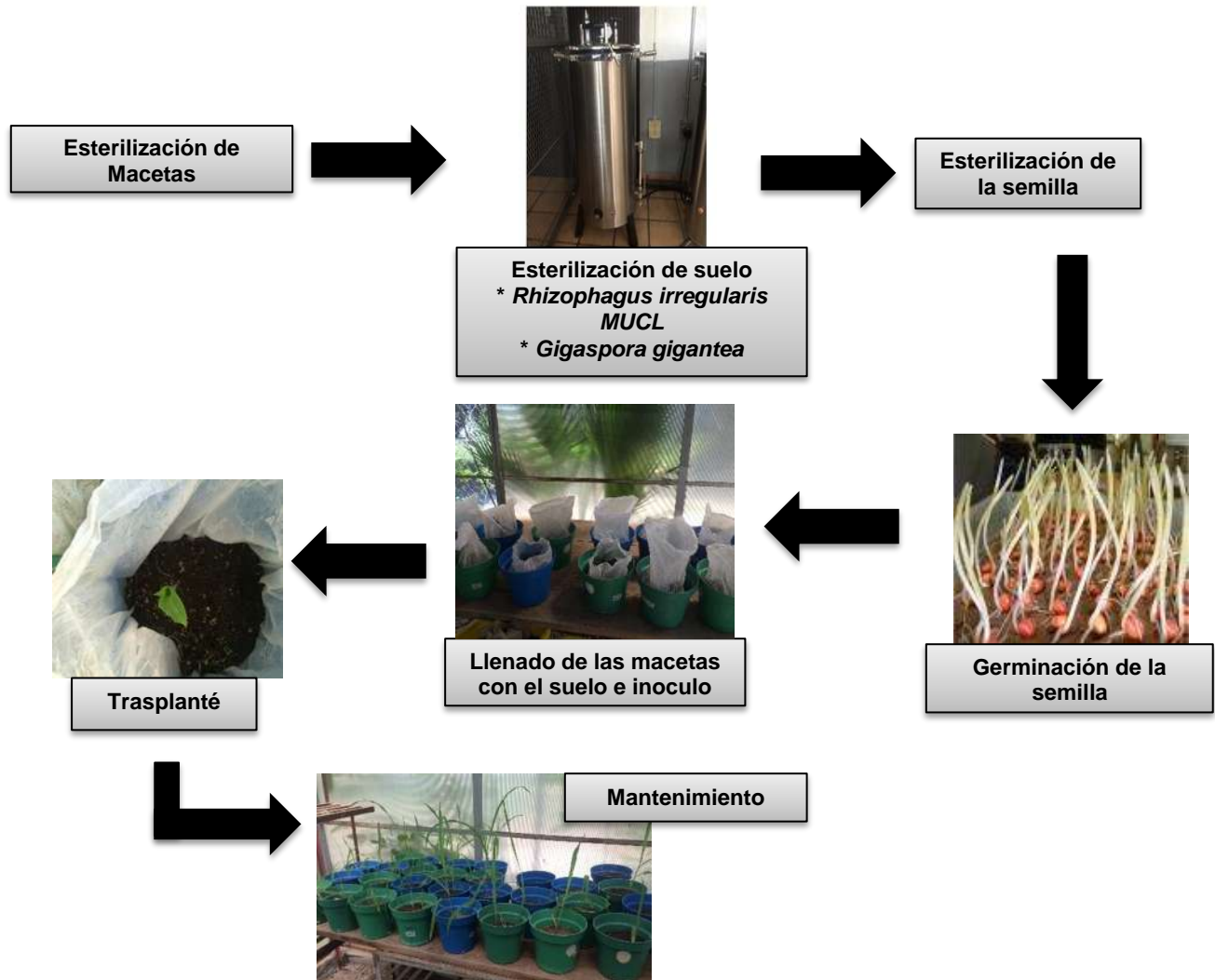


Fig. 11. Diseño experimental general de la fase de propagación de los inóculos.

7.1.4 PORCENTAJE DE COLONIZACIÓN

Al cumplir 4 meses las macetas trampa, se determinó el porcentaje de colonización. La evaluación de colonización micorrícica en las raíces de Maíz (*Zea mays*), se realizó mediante la tinción con azul de Tripano (Phillips y Hayman 1970) (Fig. 12) y se observó al microscopio electrónico las estructuras características de esta asociación (hifas, arbusculos, vesículas micelio externo y coils).

El procedimiento de tinción, consistió en la extracción de muestras de raíces en el invernadero de cinco macetas de cada uno de los inóculos las cuales se colocaron en tubos falcón para ser transportadas al Laboratorio. Las raíces colectadas fueron las más delgadas, las cuales se lavaron perfectamente con agua corriente y se eliminó el exceso de suelo adherido a ellas.

Para la tinción las raíces se pasaron a tubos de ensayo; las muestras se cubrieron con una solución de Hidróxido de potasio (KOH) al 10% calentado en baño maría a una temperatura de 50 °C (sin dejar hervir) por 10 minutos. Posteriormente se lavaron con agua para eliminar el resto de la solución.

Consecutivamente las raíces se cubrieron con Ácido clorhídrico (HCl) al 10% durante 3 a 4 minutos y se eliminó la solución sin enjuagar. Una vez aclaradas se tiñeron con azul de tripano al 0.005% en lactoglicerol, calentándose durante 10 minutos a una temperatura de 50°C en baño maría. Se retiró el colorante sin enjuagar. Finalmente se adicionó lactoglicerol limpio y se guardaron en tubos falcon para su conservación y posterior montaje.

A continuación se tomaron las muestras de las raíces teñidas y se colocaron en cajas Petri; en un portaobjetos y con pinzas, se colocaron 20 segmentos de la raíz teñida de aproximadamente 1 cm, en forma paralela y se colocó un cubreobjetos. Se montaron dos laminillas por muestra. Finalmente se determinó el porcentaje de colonización mediante la técnica de McGonigle *et al.* (1990).

Para realizar la evaluación se observó al microscopio, donde se efectuaron pasajes semejantes a cada una de las laminillas. A partir de 100 intersecciones, al revisar un campo óptico donde se encontraba un segmento que contenía hifas, vesículas, arbusculos, micelio externo,

independientemente de la intensidad de micorrización se le dio el valor de 1 para un total de 100%.

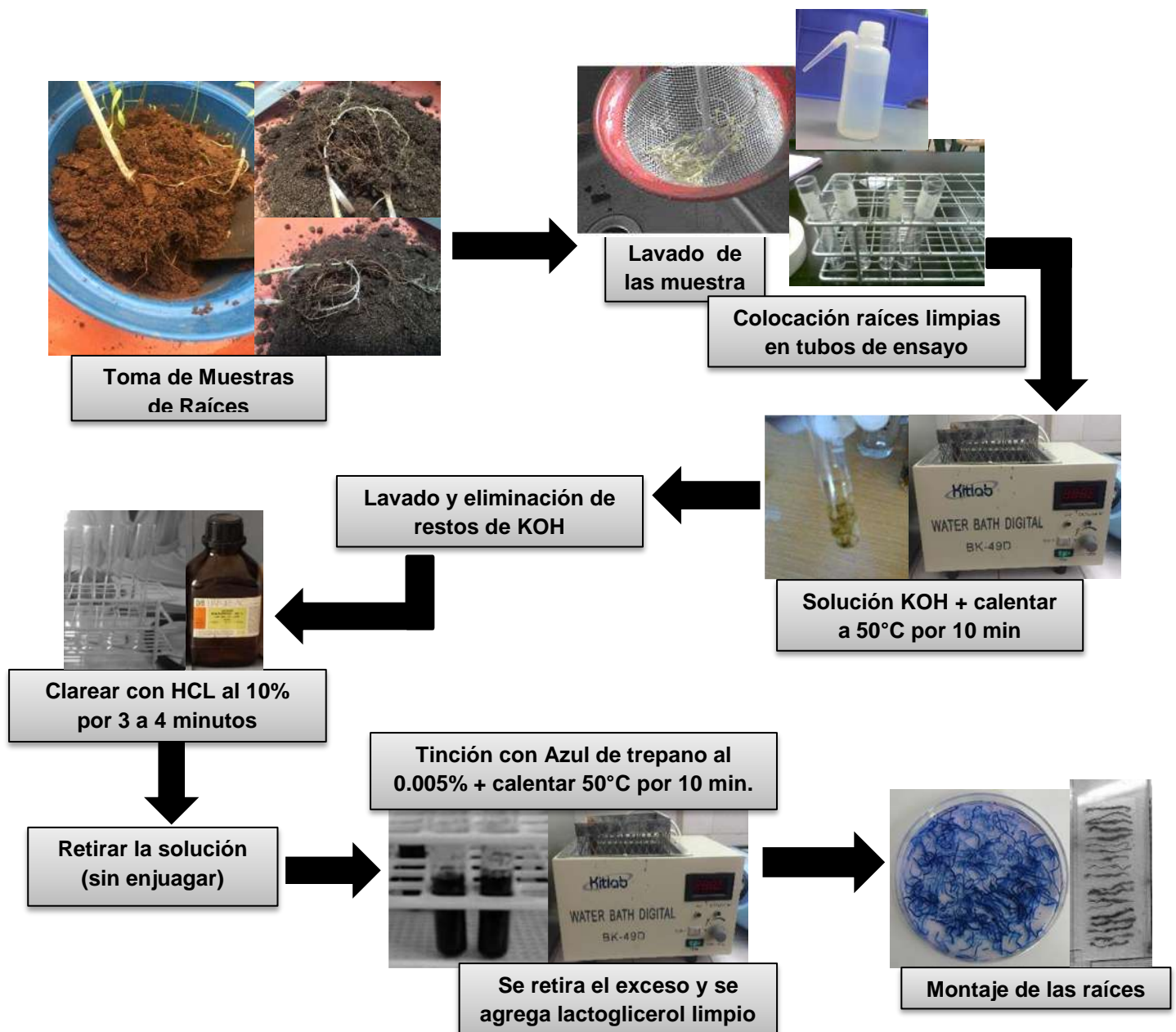


Fig. 12. Técnica de tinción con azul de Tripano para la determinación del porcentaje de colonización.

Los resultados fueron reportados como valores promedios y se sometieron a pruebas estadísticas de ANOVA utilizando el programa STATGRAPHICS Centurion XVII.

7.2 FASE 2. EFECTO PROTECTOR DE LOS HMA EN PLANTAS DE MAÍZ

7.2.1 PRUEBA DE GERMINACIÓN

7.2.1.1 Material Vegetal

Se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays*) originaria de Pajacuaran Michoacán, variedad H-318 del ciclo de producción 2015. Las semillas fueron donadas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación del municipio de Morelia, Michoacán.

7.2.1.2 Desinfección de la Semilla

Las semillas se sometieron a una desinfección, utilizando cloro comercial Cloralex® al 50% v/v por 7 minutos, con agitación, pasado este tiempo se desechó el cloro y se agregó alcohol etílico incubando durante 15 minutos manteniendo en agitación constante, finalmente se desechó el alcohol y se hicieron 7 lavados con agua desionizada estéril.

7.2.1.3 Germinación de semillas

Para la prueba germinación de la semilla se utilizaron dos técnicas una se realizó en **medio de cultivo MS** y otra en **agua estéril** (Fig. 13); esto se realizó para establecer la diferencia entre cada método, en cuanto al tiempo de germinación, el porcentaje de sobrevivencia y la talla de la plántula. El diseño experimental consistió en 10 cajas Petri y cada caja con tres semillas dando un total de 30 semillas, 15 para la prueba “*IN VITRO*” y 15 para la prueba con agua estéril. Las semillas que se utilizaron fueron seleccionadas de acuerdo al peso y características físicas como es el tamaño, el color, que las semillas no estuvieran rotas y que no presentaran indicios de deterioro; los cuales se utilizaron como indicadores de viabilidad.

Para la prueba *IN VITRO* las semillas seleccionadas con un peso entre 291-314 mg, fueron sembradas en cajas Petri con medio de cultivo MS 0.2x (Murashige y Skoog 1962), suplementado con 1% de sacarosa y con 1% de agar. En el caso de las semillas en agua, el peso de cada una de ellas estuvo en un intervalo de 339-359 mg, estas fueron colocadas en cajas Petri con filtros absorbentes y agua estéril. En ambos métodos las cajas fueron incubadas en una cámara de crecimiento (Percival AR95L).

Esquema general de la metodología

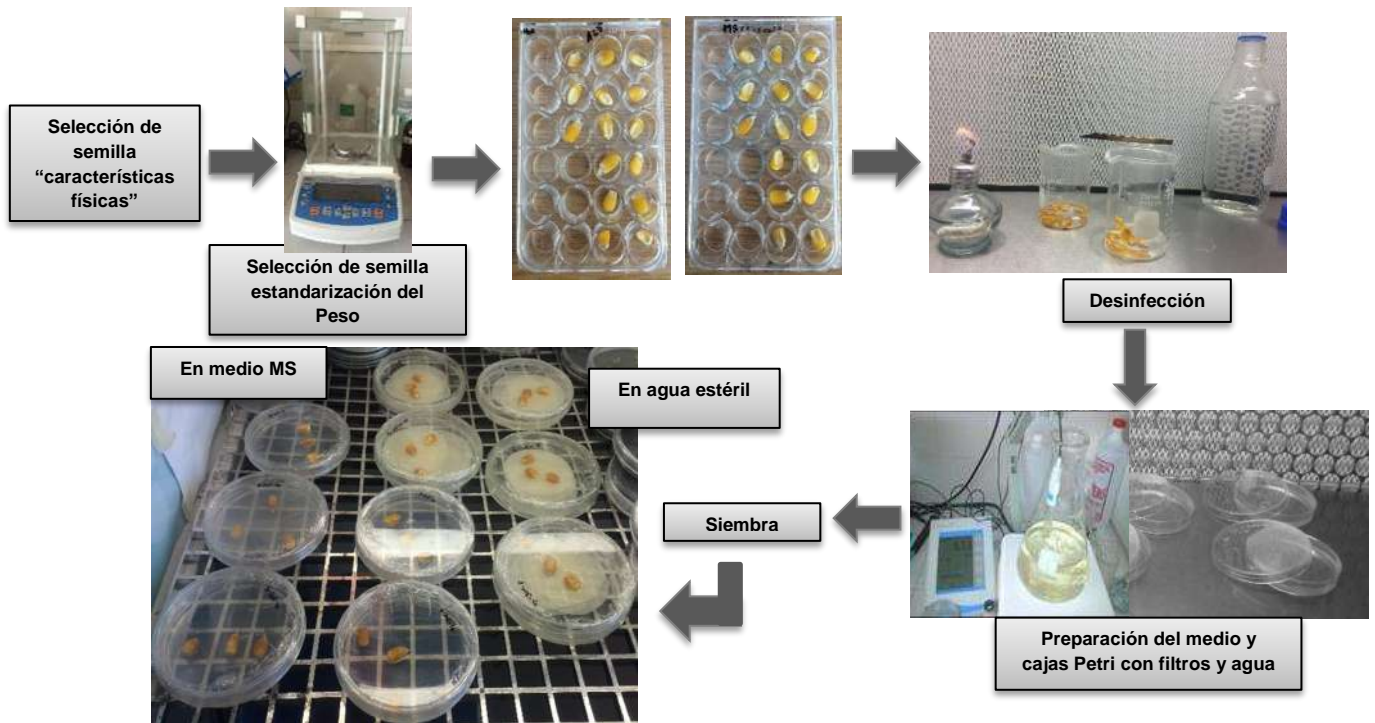


Fig. 13. Diagrama general de la metodología para la prueba de germinación

7.2.2 SUELO

El suelo utilizado fue recolectado de la capa arable del suelo proviene de la localidad de Tiripetío que está situado en el Municipio de Morelia en el Estado de Michoacán de Ocampo; debido a que es un suelo representativo del centro del país. La localidad se encuentra localizado en las coordenadas geográficas $19^{\circ}32'48''\text{N}$ $101^{\circ}20'54''\text{O}$ 19.54667 , -101.3483 y tiene una altitud de 2 020 metros sobre el nivel del mar.

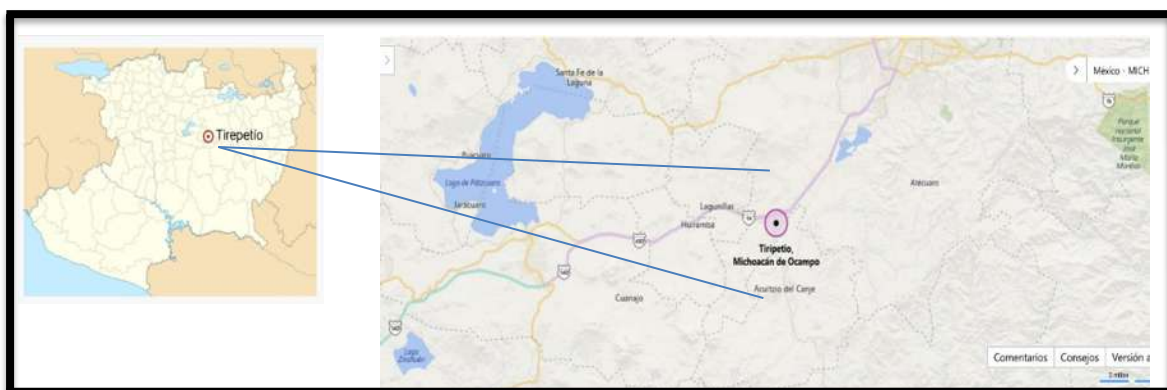


Figura 14. Ubicación del sitio donde se recolectó el suelo para el estudio.

7.2.2.1 Características del suelo

El suelo es de la clase textural franco arenoso, con un buen drenado y aireación para el desarrollo de las raíces de las plantas. Teóricamente este tipo textura al no tener alta cantidad de arcillas, permite que el Cromo y los nutrientes minerales no queden fuertemente adsorbidos en las partículas (González-Alejandre, 2016).

ANÁLISIS FÍSICOS DEL SUELO									
TEXTURA						HÚMEDAD DEL SUELO			
Arenas	Limos	Arcillas	Clase textural	Dap	DR	Porosidad	PS	CC	PMP
71.55	11.26	17.18	franco arenoso	0.9358 g cm ³	2.3624 g cm ³	60.86%	36.50%	13.90%	6.95%

ANÁLISIS QUÍMICOS DEL SUELO				
Muestra	pH	interpretación	CICT	interpretación
Tiripetio	6.07	Moderadamente ácido	23.04	media

Tabla 5. Análisis Físico y químicos del suelo de Tiripetío (González-Alejandre, 2016)

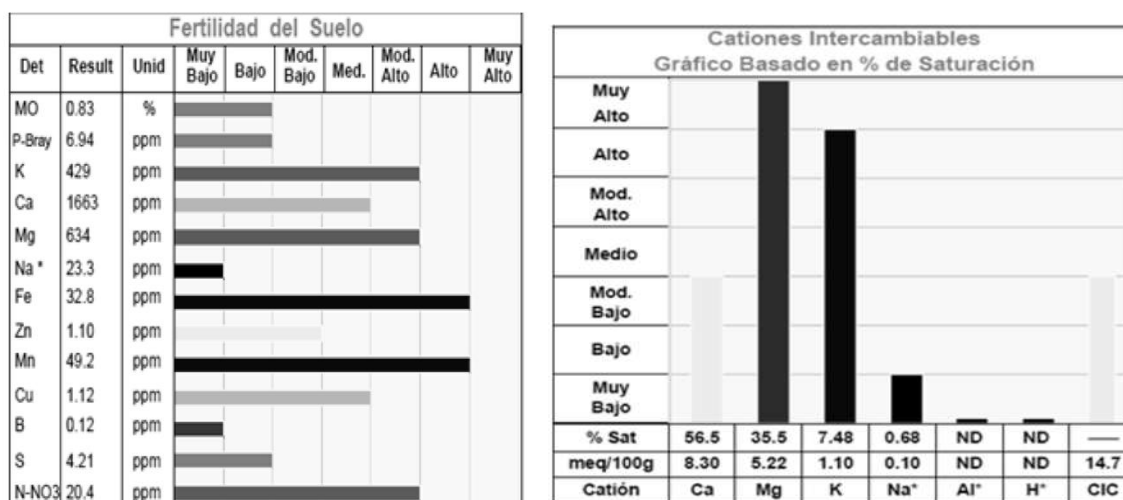


Fig. 15. Fertilidad y cationes intercambiables del suelo de Tiripetío (González-Alejandre, 2016)

7.2.2.2 Estructura del Suelo

Se entiende como estructura cuando las partículas texturales del suelo (arena, limo y arcilla) se asocian para formar agregados y a unidades (peds). La estructura del suelo afecta directamente la aireación, el movimiento del agua, la conducción térmica, el crecimiento radicular y la resistencia a la erosión. Dependiente de diversos factores tanto físicos, químicos y biológicos pueden modificar la estructura del suelo, y está directamente relacionado con la movilidad del Cromo en el suelo y su biodisponibilidad para las plantas. Para la determinación de la estructura del suelo, se utilizaron tres muestra de un kilo de suelo de Tiripetío las cuales se colocaron en bolsas de papel de 2 Kilo y fue secado en Horno a 60°C por 48 horas. Una vez secada la muestra está se volvió a pesar para determinar la cantidad de humedad perdida (disminución del peso). Consecutivamente a esto, la muestra fueron pasadas por una serie de tamices de diferentes diámetros (2000 μ , 1000 μ , 500 μ y 170 μ); a continuación se pesaron cada uno del contenido de los tamices.

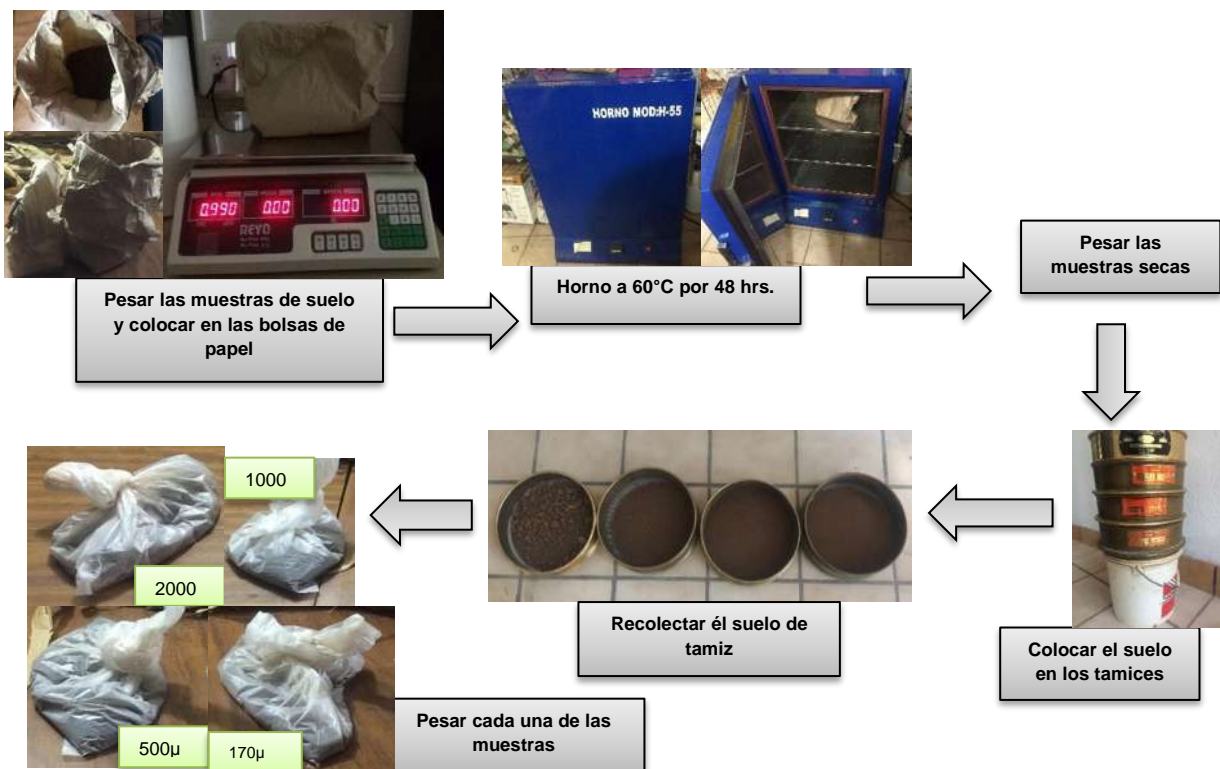


Fig. 16. Diagrama general de metodología para determinar la estructura del suelo proveniente de Tiripetío, Michoacán.

7.2.3 CRECIMIENTO DE PLANTAS DE MAÍZ (*Zea mays L.*) EN SUELO CON CROMO.

El suelo fue esterilizado en bolsas de 1 Kg, en autoclave dos veces a 120 ° C por 20 minutos y una tercera vez por 1 hora; en periodos de 48 horas cada esterilización.

Para la germinación de semillas se utilizó agua y cajas plásticas estériles; se colocaron un total de 600 semillas de un peso de entre 320-340 mg; se dejó un rango mayor al número de plántulas requeridas en la fase experimental para poder elegir las que tuvieron un tamaño similar.

Primeramente se efectuó la desinfección utilizando cloro comercial Cloralex® al 50% v/v por 7 minutos, con agitación, pasado este tiempo se eliminó el exceso de cloro y se agregó alcohol etílico manteniendo agitación constante, pasando 15 minutos se retiró el alcohol y se realizaron siete lavados con agua des-ionizada estéril.

Todo esto fue realizado en campana para mantener la esterilidad de las semillas, una vez desinfectadas se colocaron en las charolas plásticas con papel filtro y agua estéril. Se colocaron por caja aproximadamente 50 semillas para dejar un espacio considerable entre cada una y evitar el maltrato de la planta y raíz al momento de su trasplante hacia la maceta. Fueron colocadas en cámara de crecimiento.

7.2.3.1 Trasplante

El trasplante se realizó a los 10 días de que las semillas se pusieron a germinar, se seleccionaron las plantas que tuvieron una altura de 12 cm. Se usaron 100 macetas de 2 Kg las cuales fueron esterilizadas en una solución de cloro comercial al 70 % por un día.

En cada maceta se colocó el 10 % de inóculo propagado en la fase I (900 gr de suelo estéril:100 gr de inóculo). Fueron regadas a capacidad de campo y fueron colocadas en un invernadero de 4 X 6 metros, cubierto con malla sombra con una temperatura por debajo de los 30°C durante el día.

7.2.3.2 Adición de Cromo

Transcurrido un tiempo de 4 semanas se adición el cromo a cada tratamiento, utilizando Cromato de Potasio (CrK_2O_4). La solución fue aplicada a capacidad de campo (200 ml por maceta).

Tratamiento	Cromo	0	250	500	1000	Repeticiones	Total
		μM	μM	μM	μM		
<i>Rhizophagus irregularis MUCL</i>		+	+	+	+	x5	20 unidades
<i>Gigaspora gigantea</i>		+	+	+	+	x5	20 unidades
Nativo de suelo de Maíz		+	+	+	+	x5	20 unidades
Nativo de suelo con Cromo		+	+	+	+	x5	20 unidades
Testigo		+	+	+	+	x5	20 unidades

Total: 100 unidades Experimentales

Tabla 6. Diagrama del diseño experimental.

El sistema se mantuvo por 2 meses, regando una o dos veces por semana a capacidad de campo, dependiendo de las condiciones ambientales y cuando las condiciones de las plantas lo requirieron. Se adicionó solución de Nitrógeno al transcurrir un tiempo de 2 semanas posterior a la adición del Cr. A partir de la adición del CrK_2O_4 se tomaron registros semanales de sobrevivencia y se evaluaron las siguientes variables agronómicas: tamaño de la planta, tamaño de la raíz, diámetro del tallo, peso seco de la parte aérea, peso seco de la raíz y porcentaje de colonización.

7.3 FASE 3. EFECTO DE LOS HMA EN LA ABSORCIÓN DE ELEMENTOS EN BIOMASA VETEGAL

Las plantas se midieron y se secaron en una incubadora a 70°C por 48 hrs, manteniendo por separado la parte aérea y la raíz.

Se tomaron al azar dos muestras de cada tratamiento tanto de la parte aérea como de la raíz para la determinación de N y P y dos muestras para la determinación de Cromo. Una vez secas las muestras se molieron en un mortero y se guardaron individualmente en bolsas de papel encerado.

La determinación de elementos se realizó en dos etapas, una digestión acida y la cuantificación. Para la cuantificación de Cromo se utilizó un Espectro de Absorción Atómica de Perkin Elmer y para N y P la cuantificación se realizó por el método de colorimetría de hipoclorito fenol y Murphy & Riley, (1962).

Las digestiones acidas y la cuantificación de N y P se realizaron en la UNAM sede Morelia en el IIES en el Laboratorio QUAM (Química Analítica y Metabólica). Las digestiones para la determinación de Cromo se realizaron en el laboratorio de Microbiología y Genética y la cuantificación fue realizada en el laboratorio de Posgrado de Ingeniería Química de la UMSNH.

VIII. RESULTADOS

8.1 FASE 1. PROPAGACIÓN DE INÓCULOS

Se realizó la evaluación del porcentaje de colonización micorrícica, por medio de la observación de las principales estructuras que presenta la asociación. En la Figura 17 se demuestran las estructuras características (hifas, arbusculos, vesículas, micelio externo y coils).

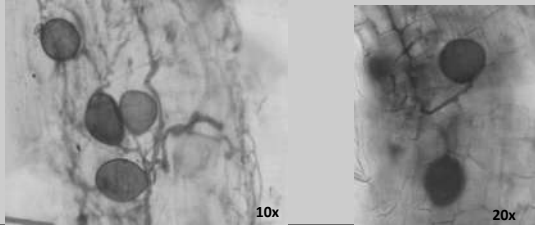
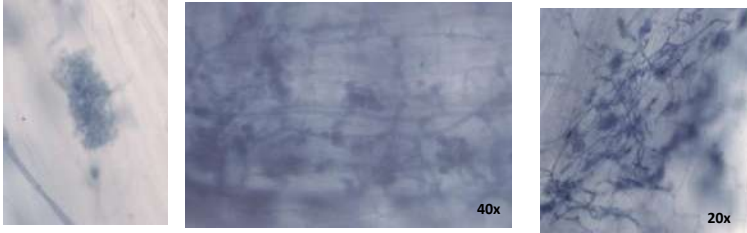
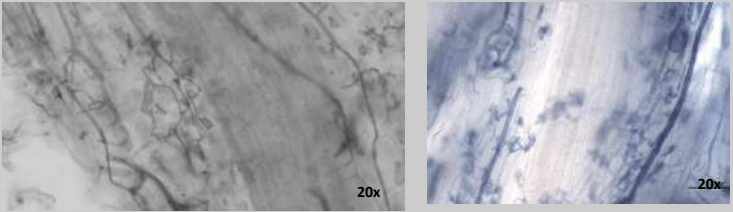
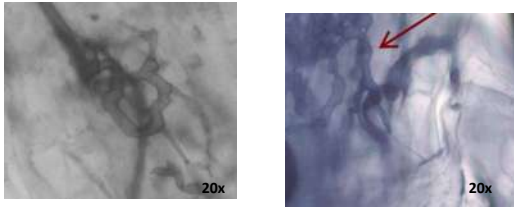
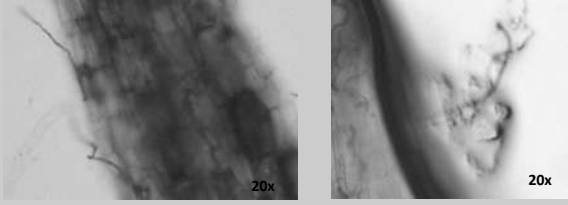
Estructura	Imagen obtenida en el microscopio electrónico
Vesícula	
Arbusculos	
Hifa	
Coils	
Micelio Externo	

Fig. 17. Estructuras básicas que forman los Hongos Micorrícicos Arbusculares

En la Figura 18 se muestra las raíces de cada uno de los inóculos teñidas con azul de tripano al 0.05%, en ella se han señalado cada una de las estructuras.

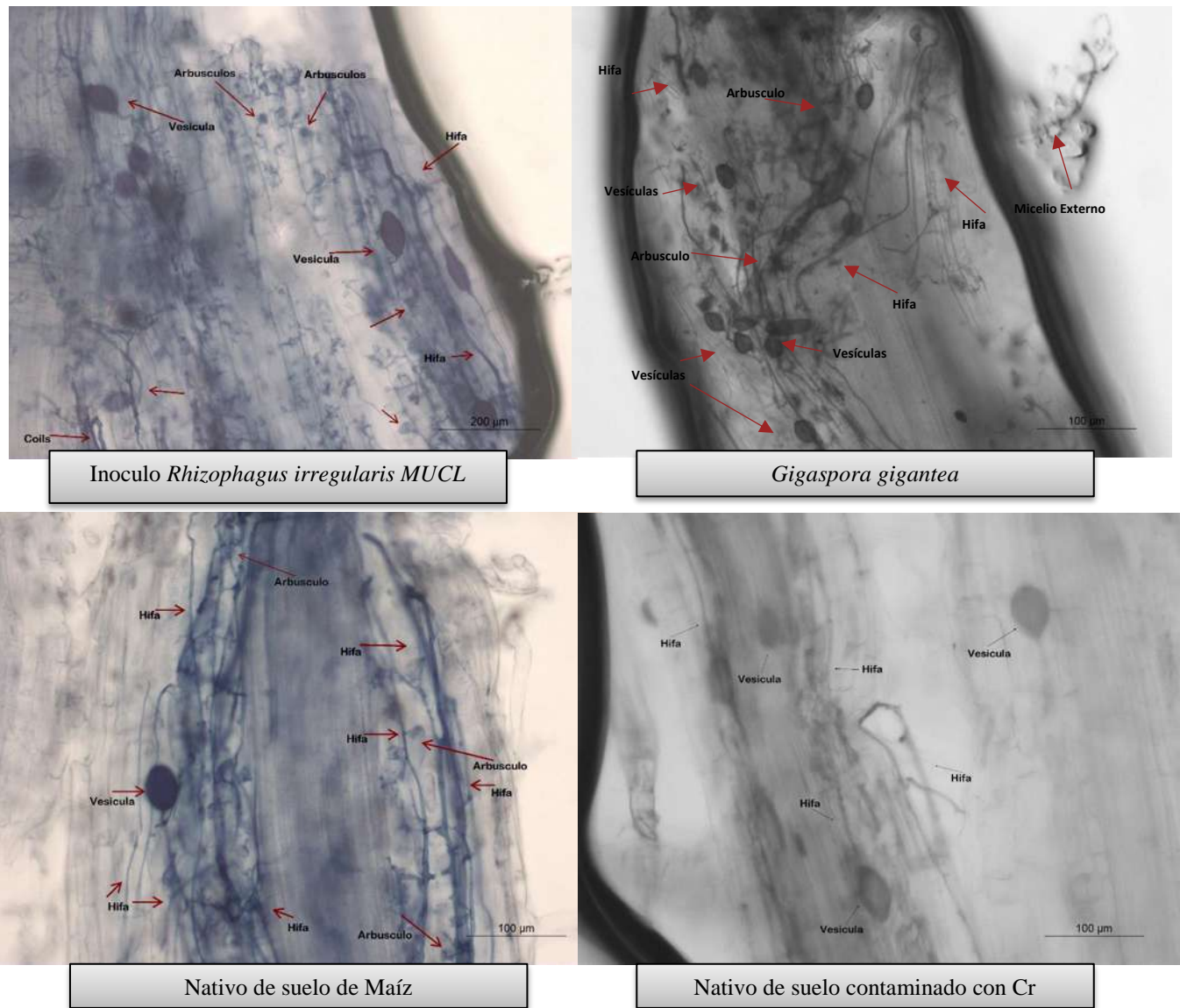


Fig. 18. Representación de raíces colonizadas con HMA.

Los resultados de porcentaje de colonización más altos pertenecieron a los inóculos puros: *Rhizophagus irregularis* MUCL (77.7%) y *Gigaspora gigantea* (72.8%). Los inóculos en los cuales se encontraban distintas comunidades nativas de HMA obtuvieron menores porcentajes de colonización. El inóculo nativo de suelo de maíz obtuvo 51.1% e inóculo nativo de suelo contaminado con cromo 43.9%. Debido a que se trata de comunidades naturales en donde coexisten en ellas varias especies de HMA, los cuales tienen diferente

especificidad funcional, que se refleja en la efectividad para colonizar. Sin embargo el inoculo nativo de suelo contaminado con 100 μ M de Cr, aun cuando reporto el porcentaje más bajo, es efectivo ya que se encuentra ante un mayor estrés con la presencia del MP (Fig.19).

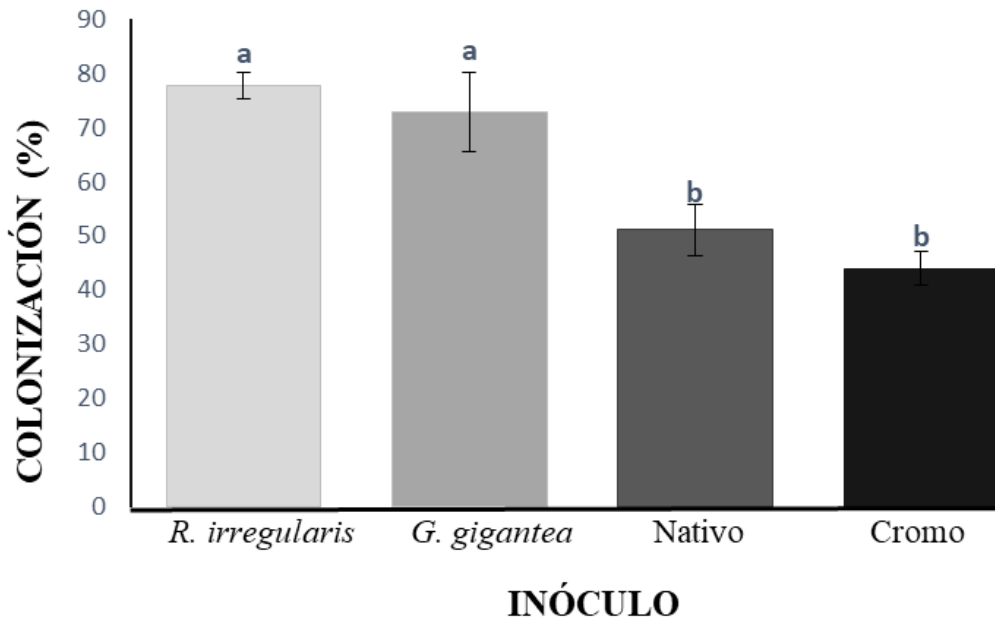


Figura 19. Porcentajes de colonización total obtenidos en la colecta de las especies repropagadas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$, Tuckey).

En las raíces de las plantas colonizadas con *Rhizophagus irregularis* MUCL se observaron los porcentajes más altos de vesículas (22.1%), hifas (36.2%), micelio externo (1.9%), coils (2.4%) (Grafica 2. A, C, D, E). *Gigaspora gigantea* obtuvo el porcentaje más alto en la cantidad de arbusculos (18.2 %) (Fig.20. B). Los porcentajes de colonización por otros hongos endófitos dentro de las raíces fueron menores, sin embargo en las raíces de las plantas con el inoculo del suelo nativo de maíz se encontró el 2.7%, por no tratarse de un inoculo puro (Fig.20. F).

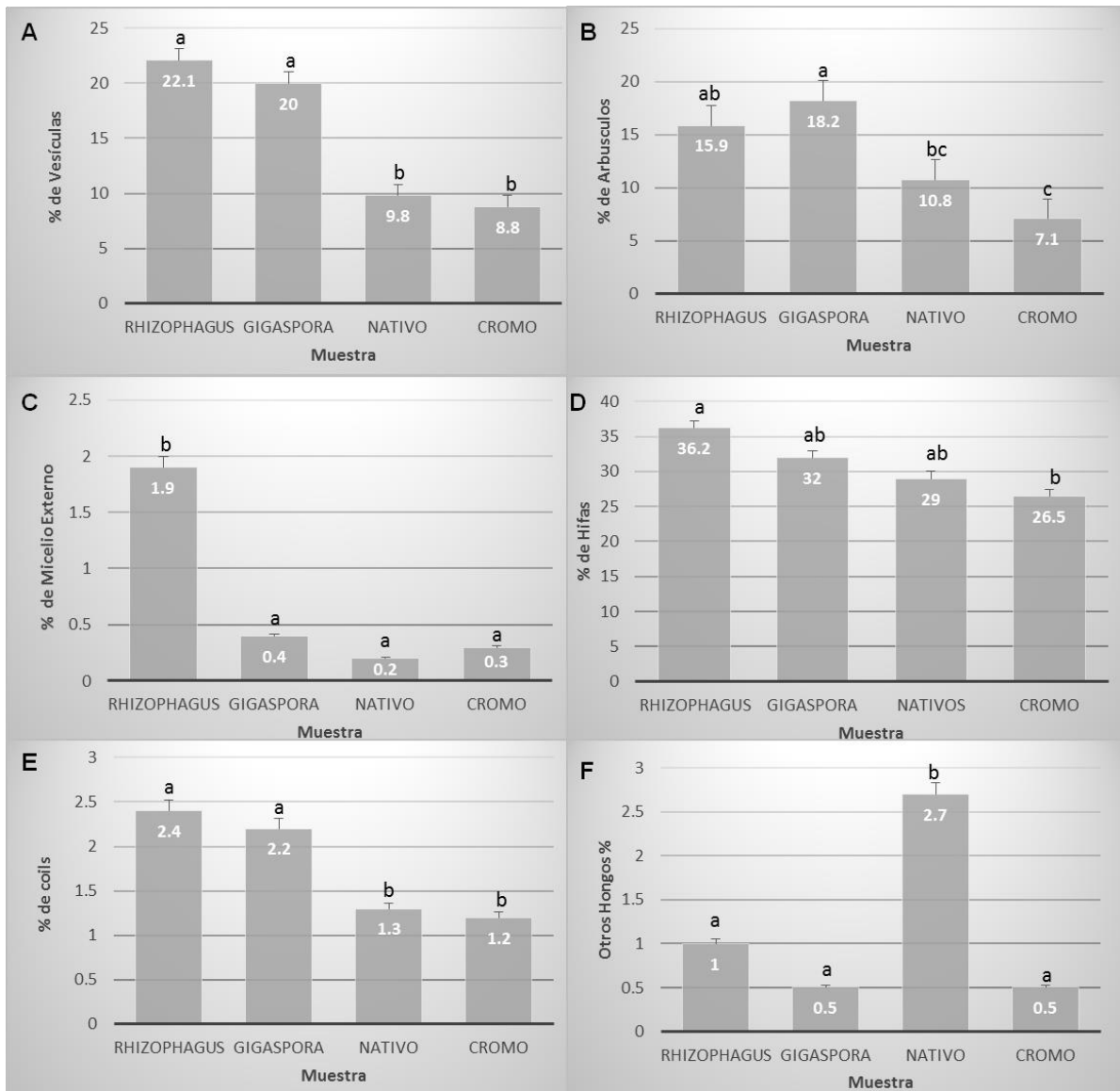


Figura 20. Porcentajes de colonización por estructuras. **A)** Vesículas, **B)** Hifas, **C)** Micelio externos, **D)** Arbusculos, **E)** Coils (hifas enrolladas) y **F)** Otros hongos. Letras diferentes indican diferencia significativa ANOVA ($p \leq 0.05$).

8.2 FASE 2. EFECTO PROTECTOR DE LOS HMA EN PLANTAS DE MAÍZ

8.2.1 ESTRUCTURA DEL SUELO

En cuanto a la estructura del suelo, se pesaron tres muestras de 1 kilo cada una del suelo proveniente de Tiripetío, después se metieron al Horno a 50°C por 48 horas.

Transcurriendo este tiempo se sacaron las muestras y se pesaron, se obtuvo un peso de 965 gramos lo cual indica que el suelo perdió un total de 35 gramos de humedad.

Estas muestras fueron pasadas por los diferentes tamices y se obtuvo el peso de cada uno de los agregados que quedaron retenidos en cada tamiz (Fig. 21).

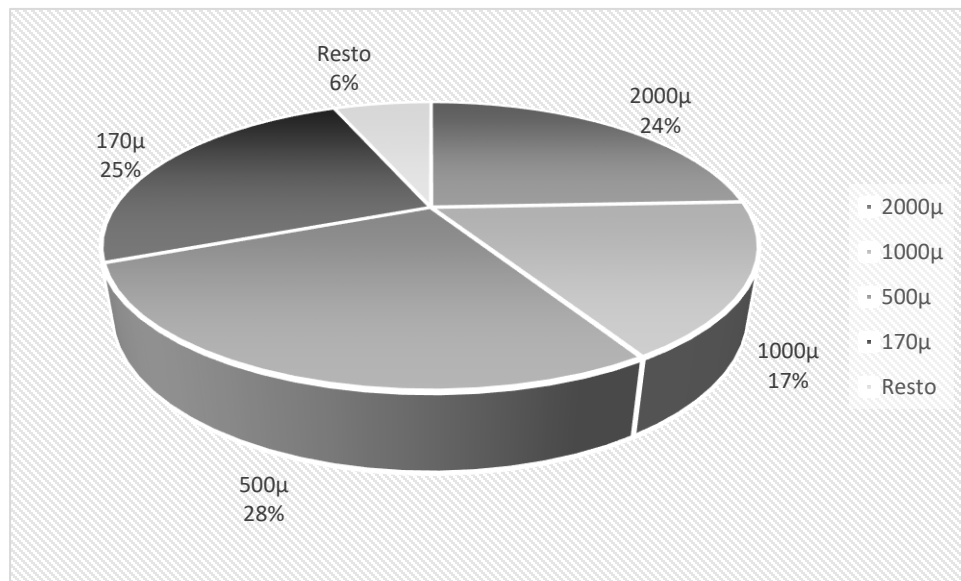


Fig.21. Porcentaje del suelo recuperado de cada tamiz.

Cada una de las partículas de cada tamiza se pesaron para determinar cuáles predominaban. Los resultados muestran que las partículas mayores o iguales a 500µ presentaron un mayor porcentaje comparado con las demás tamaños que corresponde al 28% de la muestra total.

Los pesos registrados en cada uno de los tamices fueron, para 2000µ se obtuvo un peso de 235 gr, 1000µ un peso de 165 gr, para 500µ un peso de 265 gr, para 177µ un peso de 240 gr. Se pesó el resto que de las partículas de menor tamaño de todos los tamices el cual fue de 60 gr.

Los tipos de estructura que se observaron fue granulada y la clase que presenta el suelo es muy gruesa.

8.2.2 CRECIMIENTO DE PLANTAS DE MAÍZ (*Zea mays L.*) EN SUELO CON CROMO

La supervivencia se determinó cada semana durante el tiempo que se mantuvo el experimento después de la aplicación de **Cr (VI)** 8 semanas (**Fig.22**).

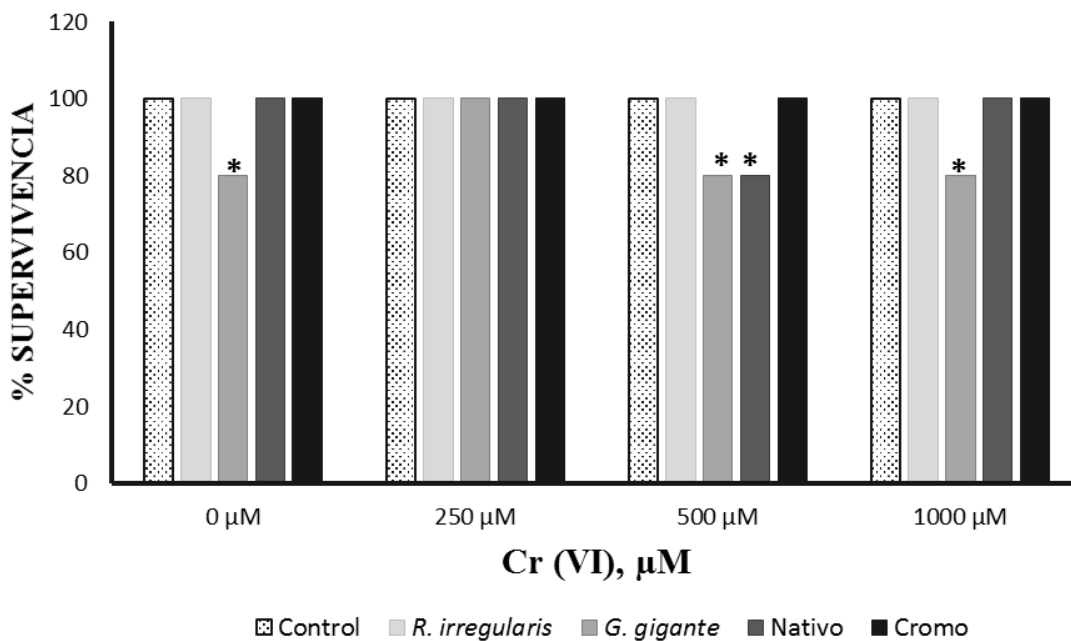


Figura 22. Porcentaje de supervivencia en plantas de maíz (*Zea mays L.*). El asterisco indica diferencia significativa para $p \leq 0.05$.

En el caso de *R. irregularis* MUCL, el inóculo proveniente del suelo contaminado con cromo y las plantas no inoculadas, tuvieron una supervivencia del 100% a las diferentes concentraciones de Cr (1000, 500, 250 y 0 µM).

El inóculo proveniente de suelos de maíz obtuvo una supervivencia del 100% en concentraciones de Cr a 0, 250 y 1000 µM, y el 80% en el tratamiento de 500 µM. Para el caso de *G. Gigantea* mostro una supervivencia del 100% de plantas únicamente para la concentración de Cromo hexavalente a 250 µM y un 80% en las concentraciones de 0, 500 y 1000µM.

Se tomó la medida de las plantas antes de agregarle la solución de Cromato de potasio, las plantas que fueron inoculadas con el consorcio perteneciente al suelo contaminado de cromo presento un mayor tamaño (50 cm) y las plantas inoculadas con *G. gigantea* reportaron el menor tamaño que corresponde a 41 cm aun comparado con las plantas que no fuero

inoculadas (control) que tuvieron una altura de 47 cm. Las plantas crecidas con el inóculo proveniente de suelos de maíz y *R. irregularis* MUCL reportaron un altura promedio de 47 y 48.2cm respectivamente.

Al utilizar diversos inóculos de HMA, se obtuvieron alturas diferentes en cada uno de los tratamientos ya que tienen diferente especificidad funcional, reflejándose directamente en el tamaño de la planta.

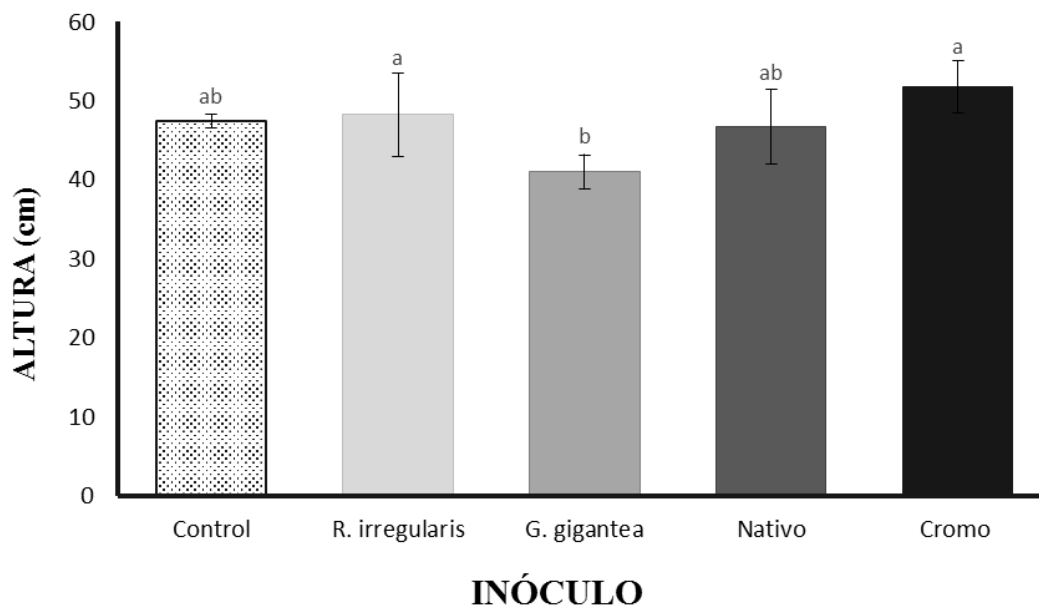


Figura 23. Altura de plantas de maíz (*Zea mays L.*), antes de la aplicación del Cromo hexavalente. Letras diferentes indica diferencia significativa para $p \leq 0.05$.

A partir de la adición de Cr (VI) se tomaron las medidas cada semana y se dio seguimiento hasta el momento de la cosecha (Fig.24).

La altura está directamente relacionada con los procesos metabólicos que favorecen la toma de nutrientes a la planta y la incorporación a su interior, la disponibilidad de agua y la toxicidad de los MP.

En la Fig. 24 se representan gráficamente las alturas semanales de las plantas de maíz expuestas a la diferentes concentraciones de Cr (VI) 0, 250, 500 y 1000 μM , los tratamientos muestra una tendencia relacionada directamente a la cantidad de Cromo. Las plantas de maíz crecieron más a concentraciones menores de Cromo (0 y 250 μM) y en las concentraciones más altas (500 y 1000 μM) el crecimiento de las plantas fue menor, incluyendo las plantas

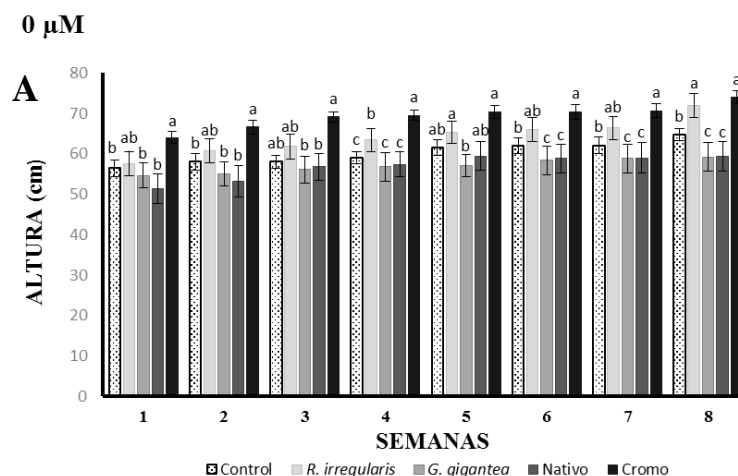
que no fueron inoculadas con HMA. También se muestra una diferenciación entre cada uno de los inóculos utilizados y las concentraciones del Meta Pesado.

Las plantas siguieron creciendo pero cuanto más tiempo permanecían en contacto con el suelo contaminado el crecimiento fue menor en promedio 1 cm por semana (Fig. 24).

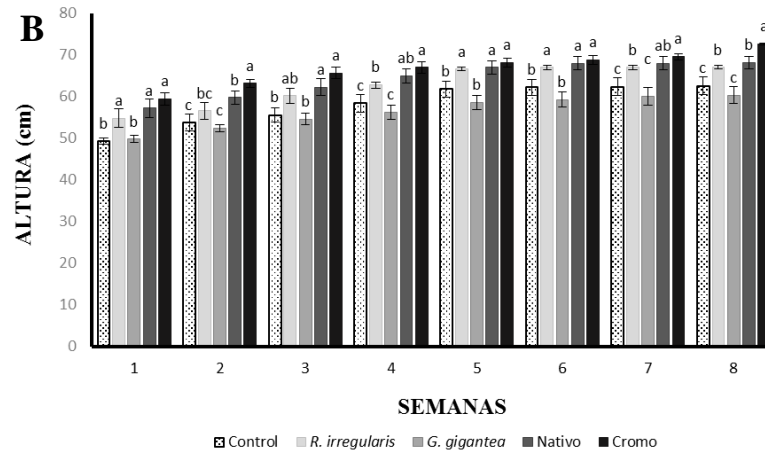
A concentraciones de 0 μM (Fig. 24 A) la altura final (semana 8) fue mayor en las plantas inoculadas con el consorcio proveniente de suelos contaminados con cromo (73.9cm) seguido por el inóculo puro *R. irregularis* (72 cm), entre *G. gigantea* (59.2 cm) y el inóculo de suelo nativo de maíz (59.4) no hubo diferencias significativas entre ellas pero si con el control (64.8).

En el caso de las plantas crecidas a 250 μM (Fig. 24 B) el inóculo de *G. gigantea* (60.38 cm) obtuvo el menor tamaño comparado con el inóculo de Cromo (72.6 cm), pero no mostró una diferencia con el control (62.2 cm). Entre los inóculos de *R. irregularis* (67 cm) y el nativo de maíz (68 cm) tampoco se observó diferencia significativa.

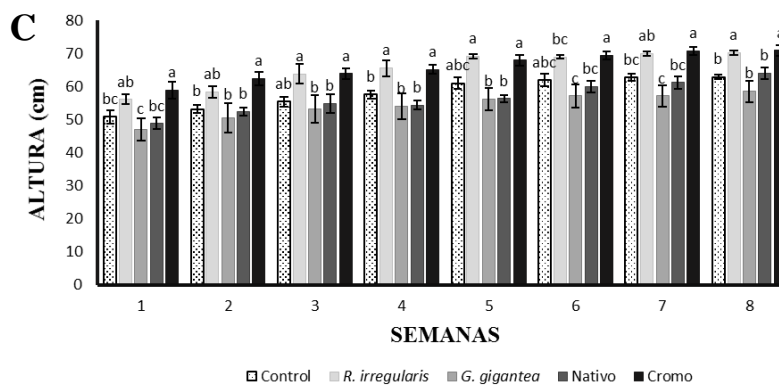
A 500 y 1000 μM las plantas con inóculo de Cromo obtuvieron el mayor crecimiento (70.9 cm y 69.2 cm) seguido por *R. irregularis* con 70.2 y 66 cm, *G. gigantea* en ambos casos obtuvo el menor tamaño que fue de 58.6 y 55.6 cm correspondientemente, inclusive el control (plantas sin inocular) reportó un mayor tamaño (62.9 y 59 cm). El consorcio proveniente de suelos nativos de maíz reportó un tamaño de 64 y 60.6 cm para los dos casos (Fig. 24 C y D).



250 μM



500 μM



1000 μM

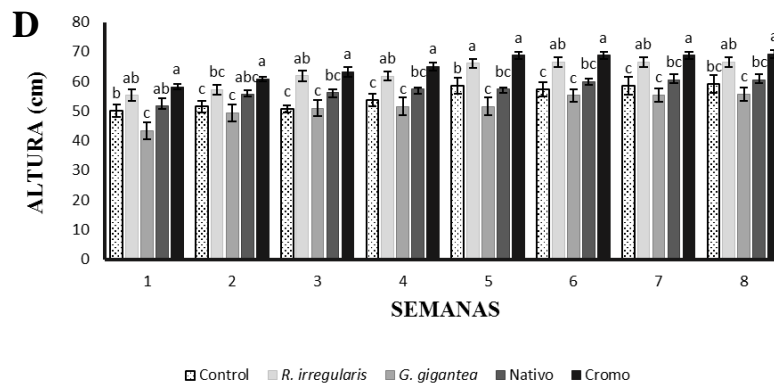


Figura 24. Efecto de la inoculación de HMA en la Altura de plantas de maíz (*Zea mays L.*) expuesta a diferentes concentraciones de Cr. **A)** Plantas a 0 μM , **B)** Plantas a 250 μM , **C)** Plantas a 500 μM y **D)** Plantas a 1000 μM . Letras diferentes indica diferencia significativa para $p \leq 0.05$.

Como se observa en la gráfica (Fig. 24 A, B, C, D) las plantas inoculas con el consorcio de suelos contaminado con cromo ($100 \mu\text{M}$) fueron las que obtuvieron el mayor tamaño a todas las concentraciones de Cromato de Potasio; debido a que las especies que se encuentran en este inoculo proviene de suelos ya contaminados tienen mayor resistencia en comparación con los inóculos que no habían estado en contacto con Cr anteriormente.



Figura 25. Plantas de Maíz (*Zea mays L.*) al mes del trasplante, antes de la aplicación de Cromo.



Figura 26. Efecto de clorosis en plantas de Maíz, sometidas a las diferentes concentraciones de Cr. **A)** Control a $1000 \mu\text{M}$ **B)** Nativo a $500 \mu\text{M}$.

Durante el periodo de crecimiento de las plantas de maíz, se pudo observar que en la segunda semana después de la aplicación de Cr (VI) las plantas de los tratamientos Control, G.

Gigantea y Nativo presentaron clorosis en las primeras hojas (Fig. 26) y posteriormente estas fueron secándose y cayendo.

En la figura 27 se muestran las plantas de cada tratamiento al mes de la aplicación de Cr, en la imagen se puede observar, la diferencia de crecimiento por inoculo a las diferentes concentraciones de cromo a las que fueron sometidas. Se observa la planta con una apariencia mayor al estrés por el Cr (VI) es el de *G. gigantea* a todas las concentraciones y las plantas más vigorosas corresponde a las plantas con inoculo proveniente de suelos contaminados con cromo.



Figura 27. Plantas de Maíz (*Zea mays L.*) después del primer mes de la aplicación de Cr..

Mientras más pasaban las plantas en contacto con el Cromo Hexavalente las hojas y tallo fueron perdiendo turgencia en todos los tratamientos excepto los que no tenían Cromo en ninguna concentración.

El efecto que tuvo la inoculación de HMA en el tamaño de la raíz en las plantas de Maíz expuestas a diferentes concentraciones de Cr (VI) (Fig. 28) se vio modificado de manera independiente por la inoculación con HMA de cada tratamiento y por la aplicación de Cr

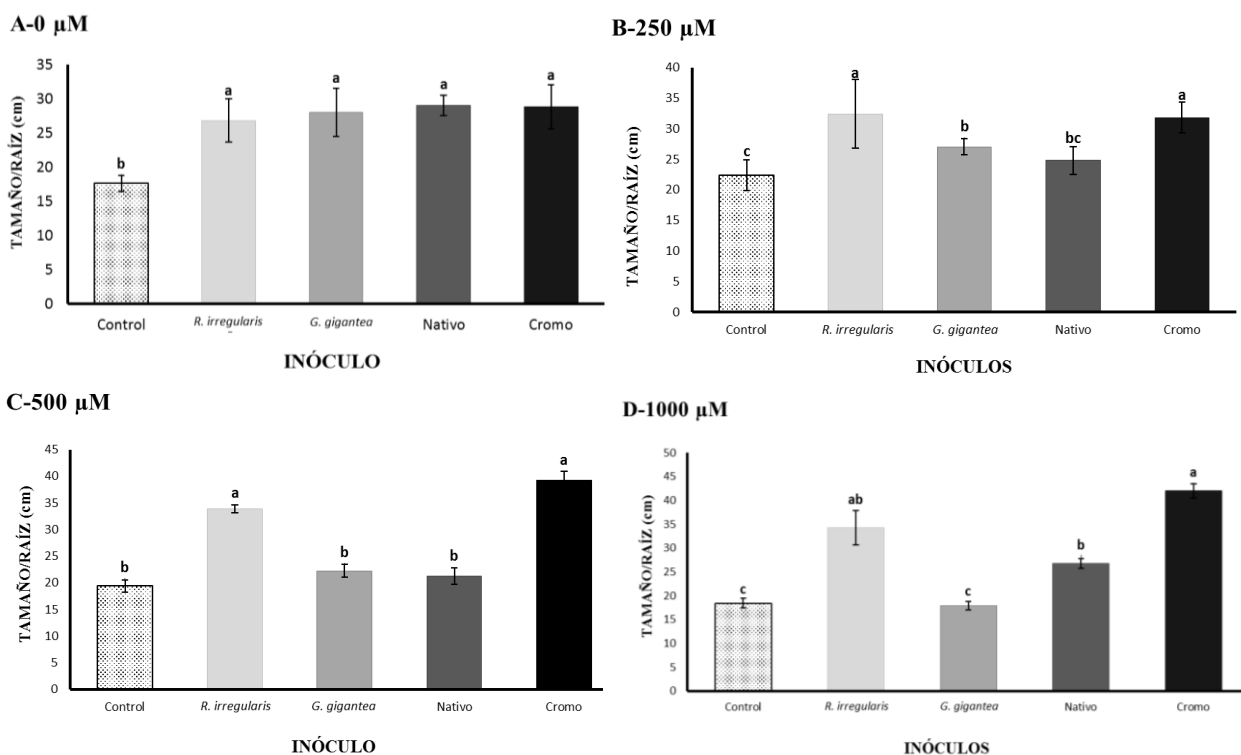
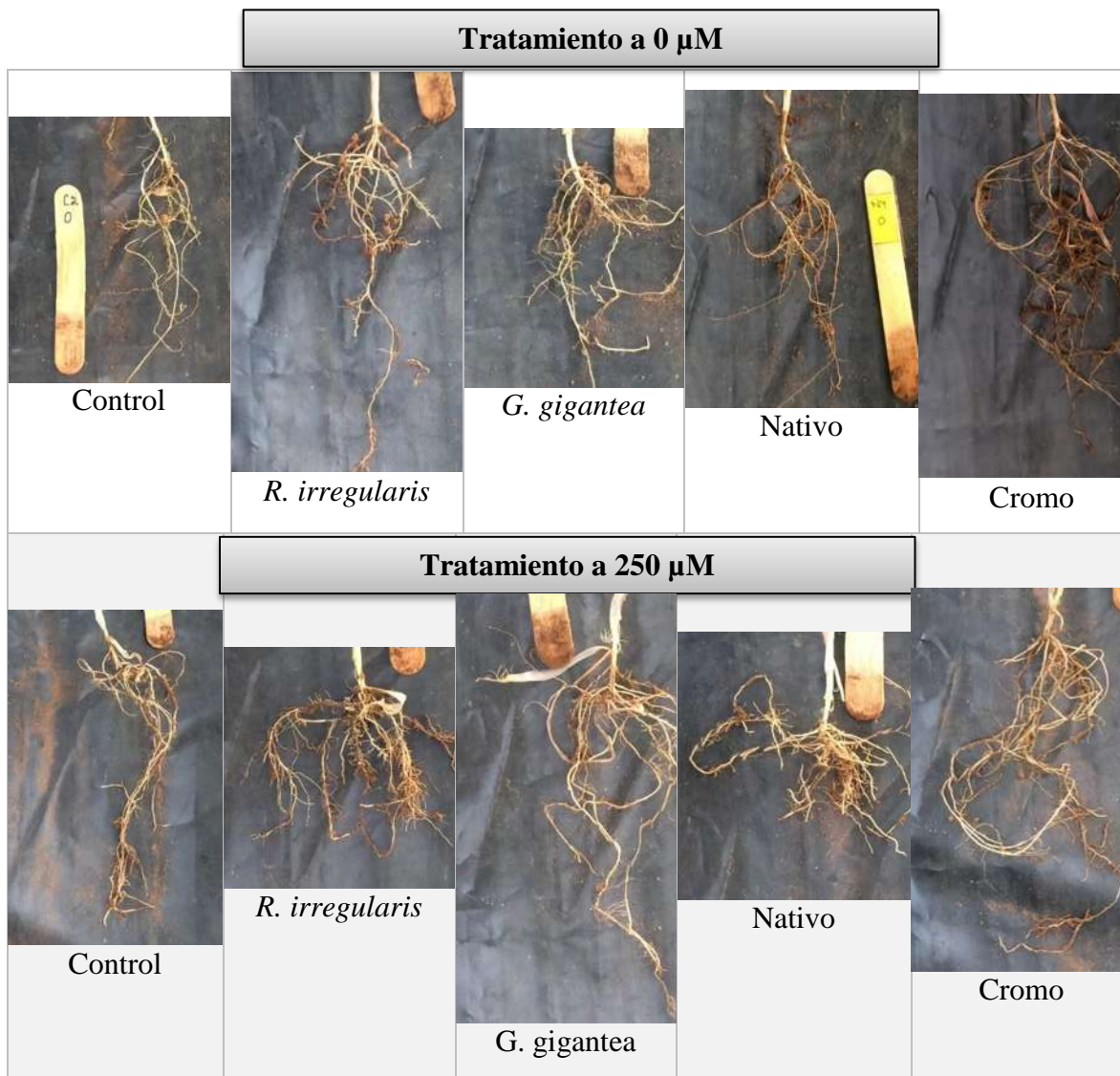


Figura 28. Efecto de la inoculación de HMA sobre el tamaño de la raíz en plantas de Maíz (*Zea mays L.*) expuestas a Cr (VI). **A)** Plantas a 0 μM, **B)** Plantas a 250 μM, **C)** Plantas a 500 μM y **D)** Plantas a 1000 μM. Letras diferentes indica diferencia significativa para $p \leq 0.05$.

La raíz es el órgano vegetativo de la planta adaptado para la absorción y conducción de agua con sales minerales. Además fija la planta al substrato y almacena sustancias. Al ser la parte de la planta que se encuentra directamente en contacto con el suelo, su desarrollo puede verse afectado por los MP que en él se encuentran.

Se midió el tamaño de la raíz (cm) al final de las 8 semanas en las que se mantuvieron las plantas sometidas al Cromo. En la gráfica 28 se muestran los diferentes tratamientos de HMA a las diferentes concentraciones de Cromo Hexavalente (0, 250, 500 y 1000 μM), se compara la longitud de las raíces de las plantas de maíz.

R. irregularis y el inóculo de Cromo mostraron un incremento en la longitud de la raíz a medida que las concentraciones de Cr (VI) aumentaron, para el inóculo de Cromo los valores obtenidos fueron 28.8, 31.8, 39.8 y 42 cm y para *R. irregularis* obtuvo 26.8, 32.4, 32.9 y 34.3 a 0, 250, 500, 1000 μM correspondiente. El inóculo puro de *G. gigantea* a diferencia de *R. irregularis* y el inóculo de Cromo mostro un decrecimiento conforme la concentración de Cr (VI) aumentaba obtenido 28 cm a 0 μM , 27 cm a 250 μM , 22.2 cm a 500 μM y 17.8cm a 1000 μM . Cada inóculo le confirió a la planta una diferente estrategia, y aunque los valores varían dependiendo la especie utilizada todos obtuvieron mayor tamaño en comparación con el Control en los cuatro tratamientos, además de un desarrollo mayor de raíces secundarias.



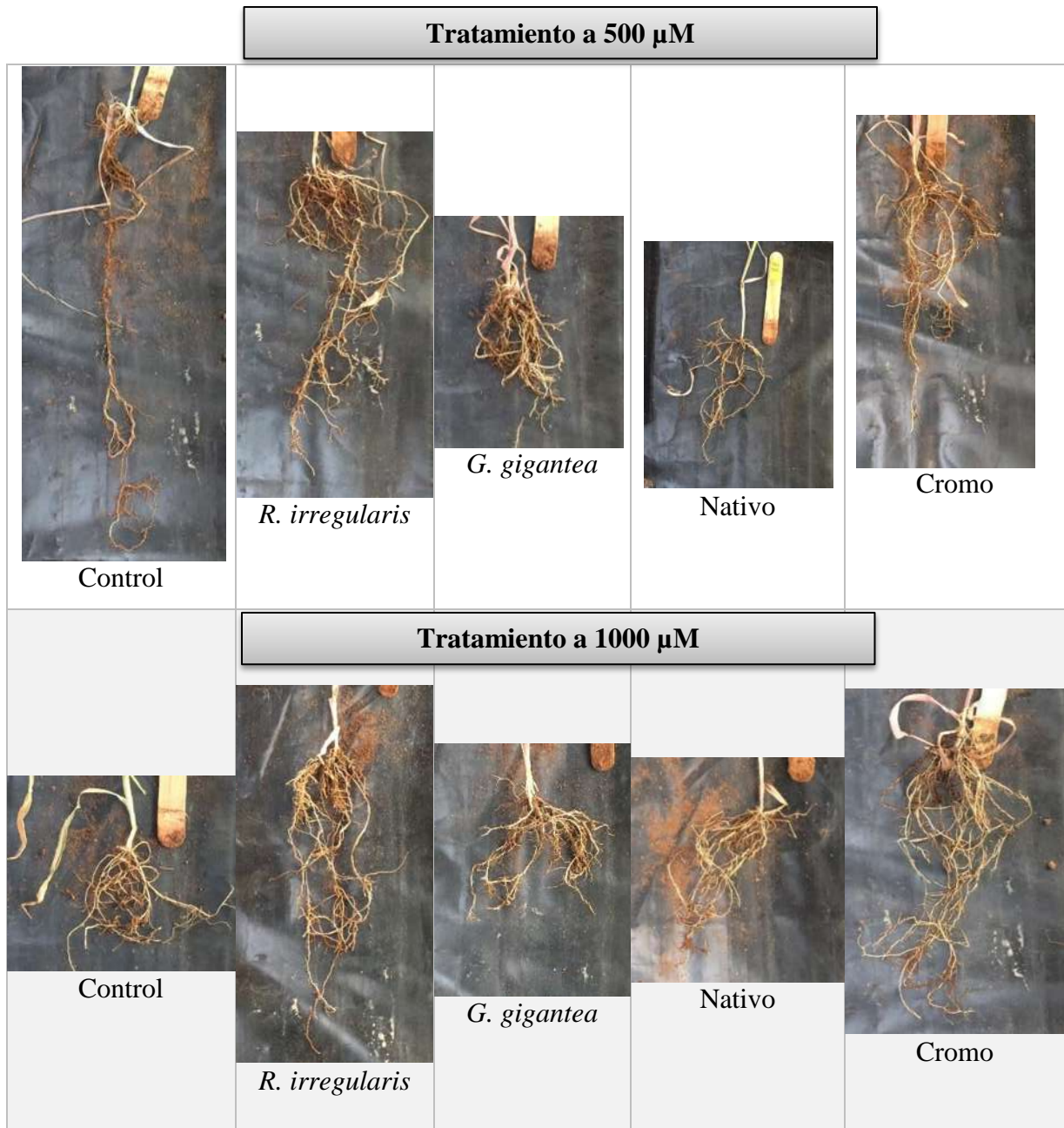


Figura 29. Efecto del Cromo (VI) en el crecimiento de raíces.

Además de la altura y el tamaño de la raíz también se midieron otras variables agronómicas al final del experimento que fue el Diámetro del tallo y el ancho de las Hojas, esto con el objetivo de conocer si existe variabilidad dependiendo de los HMA utilizados (Fig. 30 A y B).

El diámetro fue mayor en los tratamientos que fueron inoculados con *R. irregulares*, Nativo y Cromo comparado con el Control y con el inoculo de *G. gigantea* que obtuvieron los

tamaños más pequeños (Fig. 30 A). Cromo refleja el mayor tamaño a 250 μM de 6.4 mm y *G. gigantea* el menor a 1000 μM de 2.4 mm.

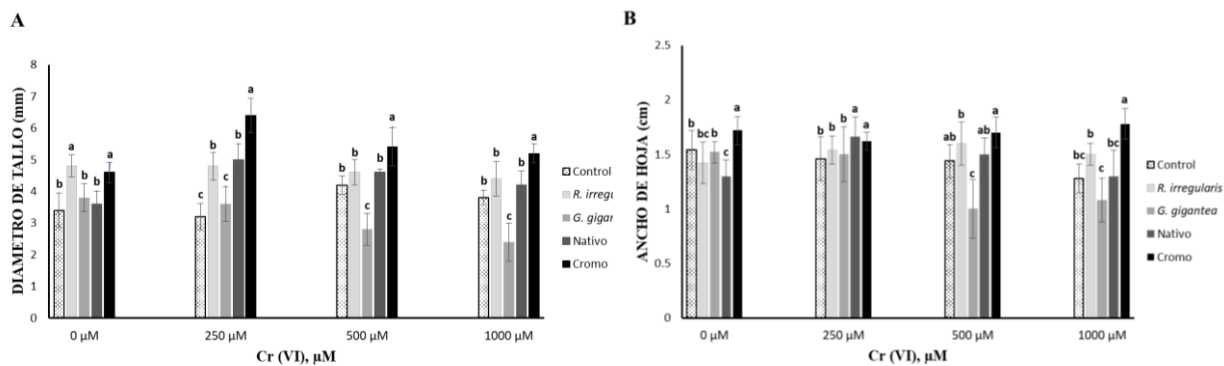


Figura 30. Comparación de variables Agronómicas (Diámetro de tallo y Ancho de Hojas) de plantas de maíz (*Zea mays L.*) expuesta a Cr (VI). Letras diferentes indica diferencia significativa para $p \leq 0.05$.

En cuanto al Ancho de las Hojas se midió el ancho de todas las hojas y se promedió; para este caso no se refleja un gran diferencia entre los tratamientos y las concentración de Cr, el mayor valor fue obtenido por el inoculo de Cromo a 1000 μM (1.78 cm) y el menor valor para *G. gigantea* a 500 μM (1 cm) (Fig. 30 B).

8.2.2.1 Efecto del Cr (VI) en la Colonización Micorrízica de los HMA en plantas de Maíz (*Zea mays L.*)

La colonización micorrízica total en plantas de maíz muestra que no hay una interacción entre las concentración de cromo, sino que depende directamente de las especies de HMA (Fig. 31). *G. gigantea* obtuvo el mayor porcentaje de colonización a 250 y 500 μM de 19 y 20.8 % correspondientemente y *R. irregularis* a 0 y 1000 μM de 19 y 18.8%. Los porcentajes más bajos fueron obtenidos por *R. irregularis* (3.9%), por el inoculo proveniente de suelos Contaminados con Cr (7.1%) y por el inoculo de suelos Nativo de maíz (7%) a 250 μM .

En las raíces de las plantas colonizadas con el inoculo proveniente de suelos contaminados con cromo, se observó el mayor porcentaje de hifas (14.8%) a 500 μM y la mayor cantidad de otros hongos endófito encontrando el 25.3% a 500 μM y 17.1 a 1000 μM . (Fig. 32 A y Fig. 33).

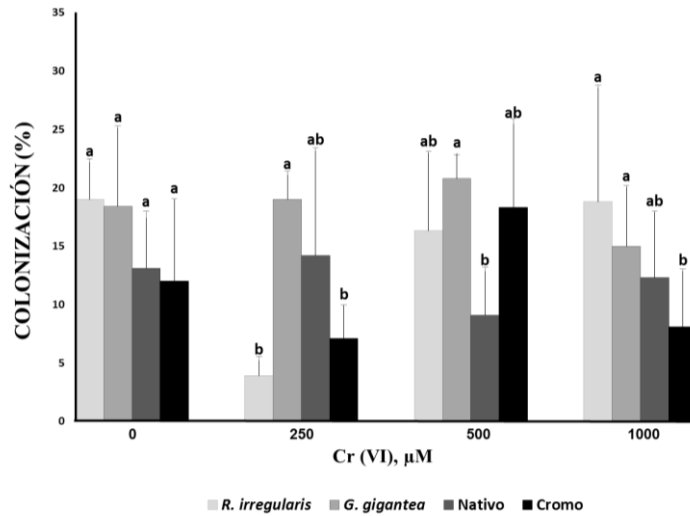


Figura 31. Porcentaje de colonización en plantas de Maíz (*Zea mays L.*) expuestas a diferentes concentraciones de Cr (VI). Letras diferentes indica diferencia significativa para $p \leq 0.05$.

Gigaspora Gigantea reporto el mayor porcentaje en la cantidad de Arbusculos (2.5%) a 500 µM y de Micelio Externo (11.2%) a 1000 µM. (Fig.32 B y D).

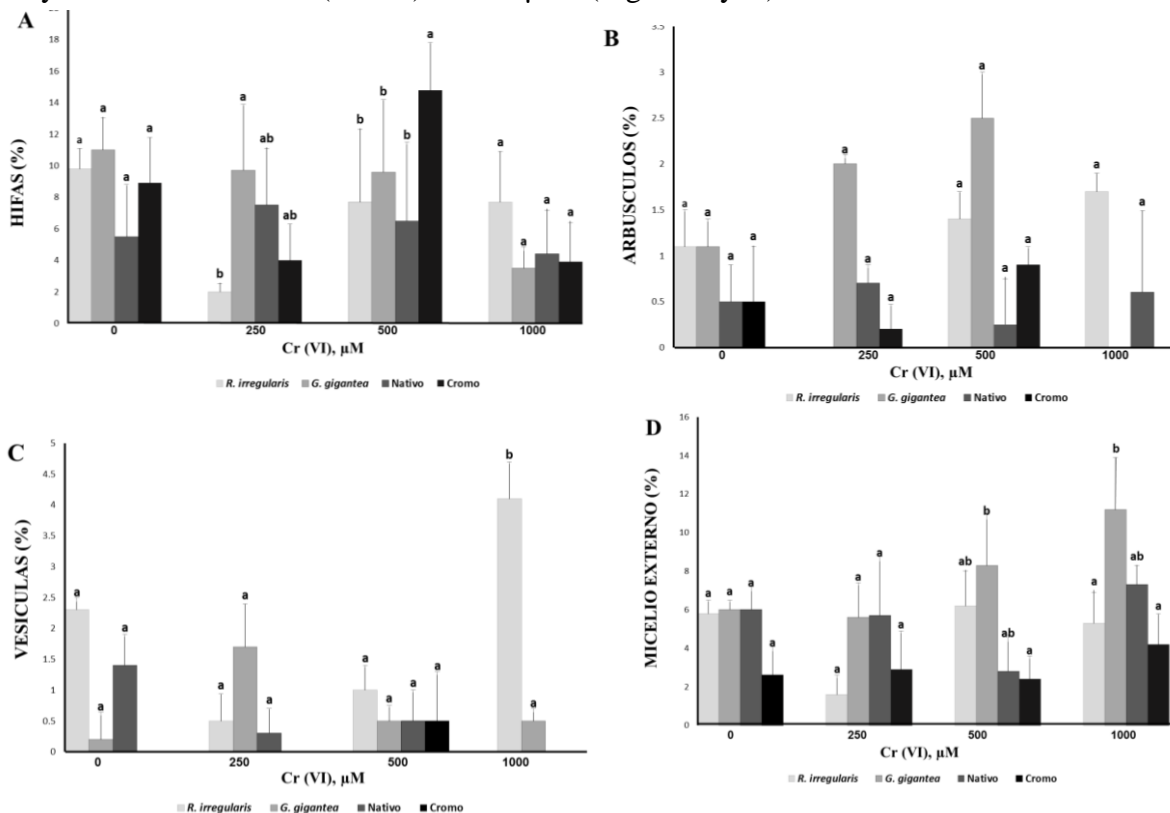


Figura 32. Porcentaje de colonización por estructura en plantas de Maíz (*Zea mays*) expuestas a diferentes concentraciones de Cr (VI). A) Hifas, B) Arbusculos, C) Vesículas y D) Micelio Externo. Letras diferentes indica diferencia significativa para $p \leq 0.05$.

Las raíces de las plantas colonizadas con *R. irregularis* MUCL a 1000 μM presentaron el porcentaje mayor de vesículas (4.1%) (Fig. 32 C).

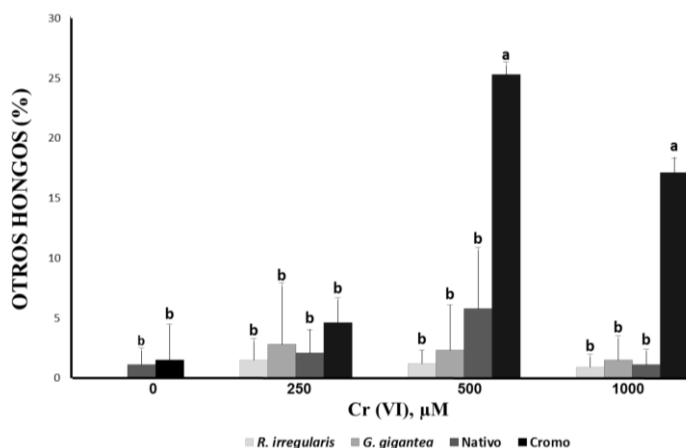
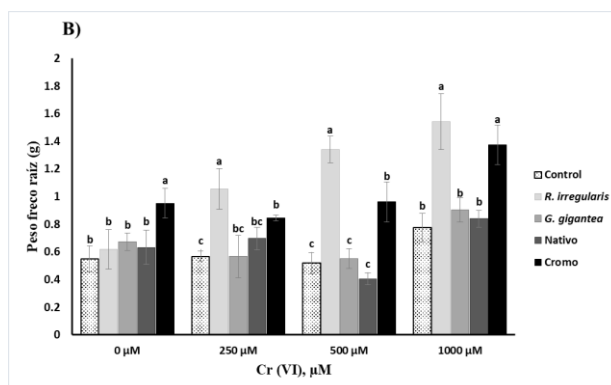
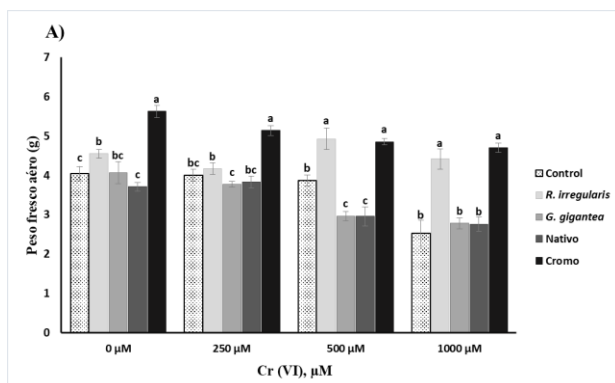


Figura 33. Porcentaje de colonización de otros Hongos en plantas de Maíz (*Zea mays L.*) expuestas a diferentes concentraciones de Cr (VI). Letras diferentes indica diferencia significativa para $p \leq 0.05$.

8.2.2.2 Efecto de la inoculación de HMA en la Biomasa fresca y seca de plantas de maíz sometidas a diferentes concentraciones de Cr (VI)

En la Figura 34 se muestran las gráficas correspondientes al peso fresco y seco de la parte aérea y raíz. Los HMA tuvieron un efecto significativo en el aumento del peso fresco tanto en la parte aérea como en la raíz.

Con referencia al peso fresco de la parte aérea (Fig. 34 A), este fue disminuyendo conforme aumentaron las concentraciones de Cr (VI) en todos los tratamientos. Mientras que a diferencia con el peso fresco de la raíz (Fig. 34 B) este aumento conforme las concentraciones de Cromo también aumentaban.



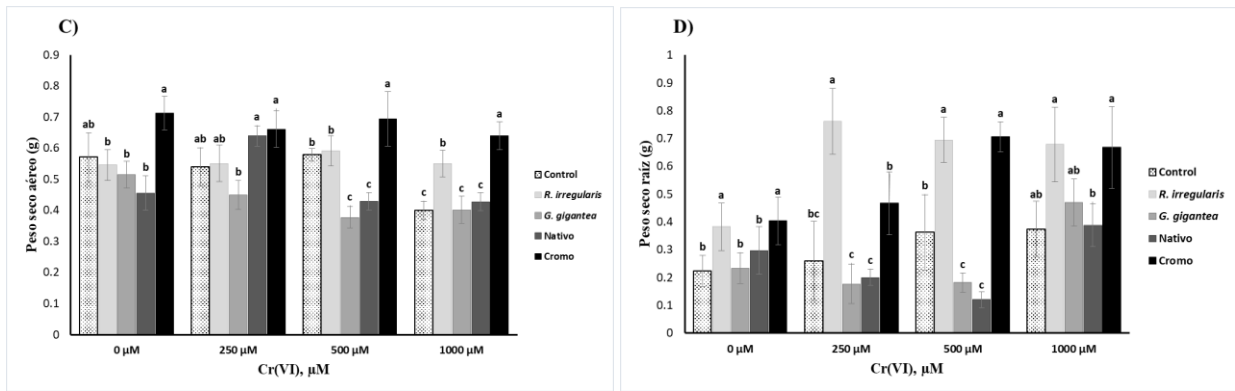


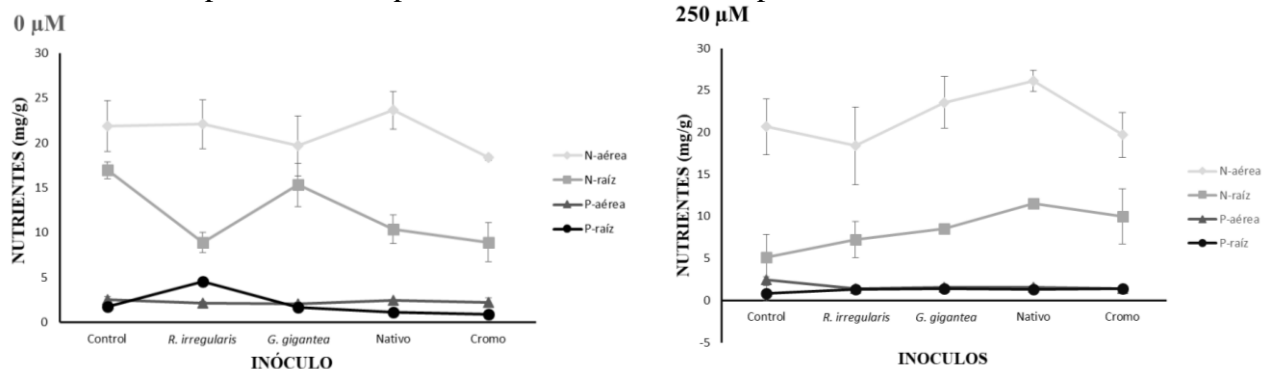
Figura 34. Peso Fresco y seco en plantas de Maíz (*Zea mays* L.) expuestas a diferentes concentraciones de Cr (VI). A) Peso fresco parte aérea, B) Peso fresco raíz, C) Peso seco parte aérea y D) Peso seco raíz. Letras diferentes indica diferencia significativa para $p \leq 0.05$.

Las plantas fueron colocadas en Horno a 60 ° C durante un periodo de 48 hrs, hasta que el peso fue constante con el objetivo de extraer toda el agua posible lo que corresponde al peso seco de la muestras. Hubo una pérdida de peso de la parte aérea entre un 70-90 %, mientras que para las raíces la pérdida de peso fue entre un 50-60% en la mayoría de los tratamientos (Fig. 34 C y D). Esto demuestra que el Cr disminuyó el peso seco de la parte aérea de manera proporcional, tanto en plantas inoculadas con HMA como en las que no fueron inoculadas y el peso seco de la raíz se vio incrementado de manera significativa por la inoculación con HMA.

8.3 EFECTO DE LOS HMA EN LA ABSORCIÓN DE ELEMENTOS EN BIOMASA VEGETAL

8.3.1 Cuantificación de Nitrógeno y Fósforo

El nitrógeno y el fósforo son elementos primarios de las plantas, involucrados en la formación de proteínas, componentes de la clorofila e imprescindibles en la fotosíntesis.



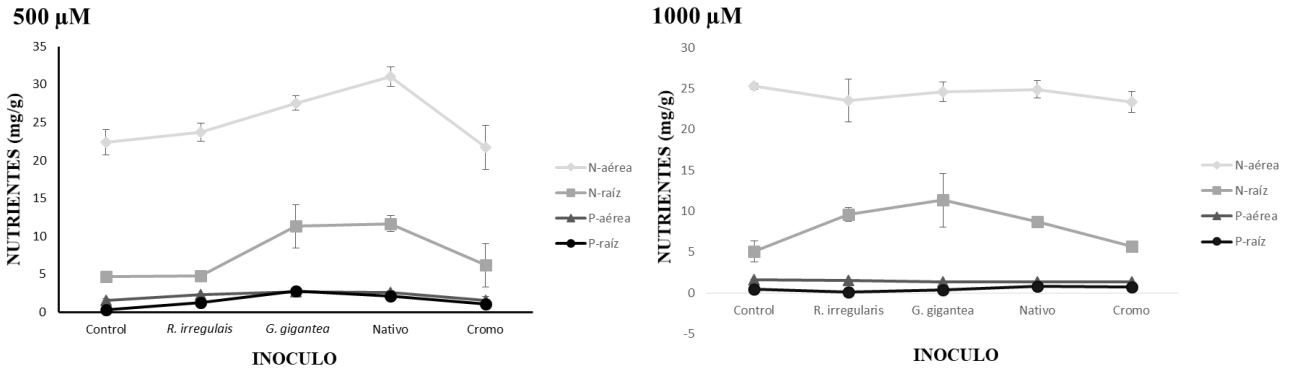


Figura 35. Concentración de Nitrógeno y Fósforo en plantas de maíz expuestas a diferentes concentraciones de Cr (VI). (N-aéreo= Nitrógeno en parte aérea, N-raíz=Nitrógeno en parte raíz, P-aérea= Fosforo en parte aérea, P-raíz= Fosforo en parte raíz) Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$, Tuckey)

Los resultados muestran que los valores más altos en cuanto a la cantidad de Nitrógeno oscilan entre 20 y 26 mg/g en la parte aérea (tallo y hojas) pero que los valores disminuyen en las raíces mostrando valores entre 4.7 mg/g. (Fig. 35).

Lo mismo ocurre para el fosforo la cantidad más alta se encuentra en la parte aérea y disminuye en la raíz, los valores encontrados van de los 0.280 a 2.96 mg/g. (Fig. 36). Comparado con el N la cantidad del P es relativamente más bajo, esto se debe a que el P es uno de los elementos menos solubles y asimilable por las plantas.

En la Figura 35 se observa que no existe una relación entre la cantidad de N y P en las plantas con las diferentes concentraciones de Cromo y que este no afecta su absorción.

8.3.2 Cuantificación de Cromo

En la figura 36 se muestra una comparativa general de la absorción de cromo en la parte aérea y la raíz. Normalmente en los suelos existe la presencia de Cromo principalmente en forma trivalente estas concentraciones pueden encontrarse en 0.1-0.5 mg/kg lo cual no es considerado toxico. Por esta razón en el tratamiento que no fue suplementado con Cromo hexavalente las plantas absorbieron cantidades mínimas de este elemento.

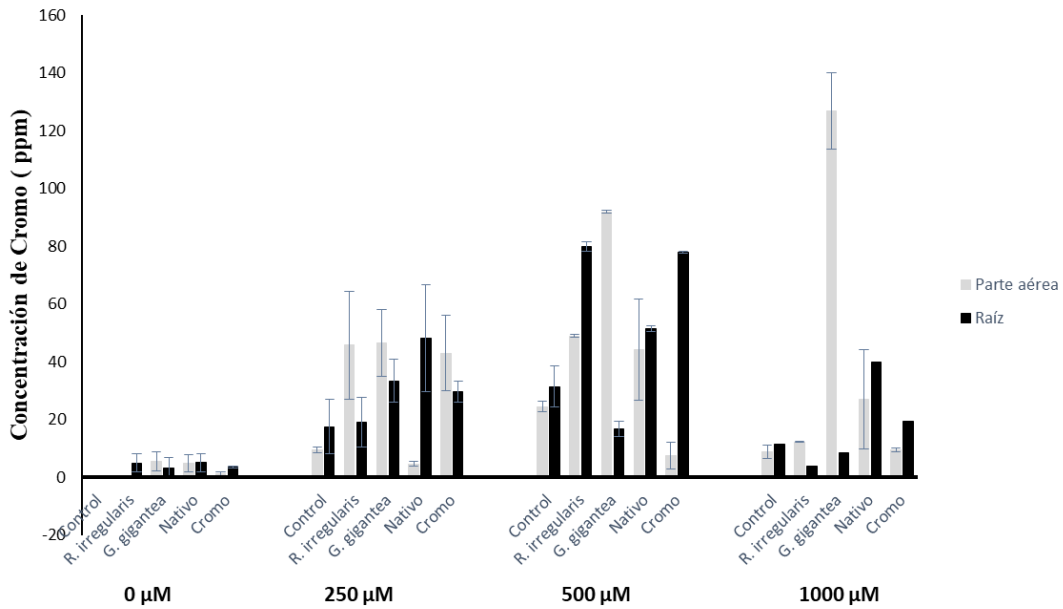
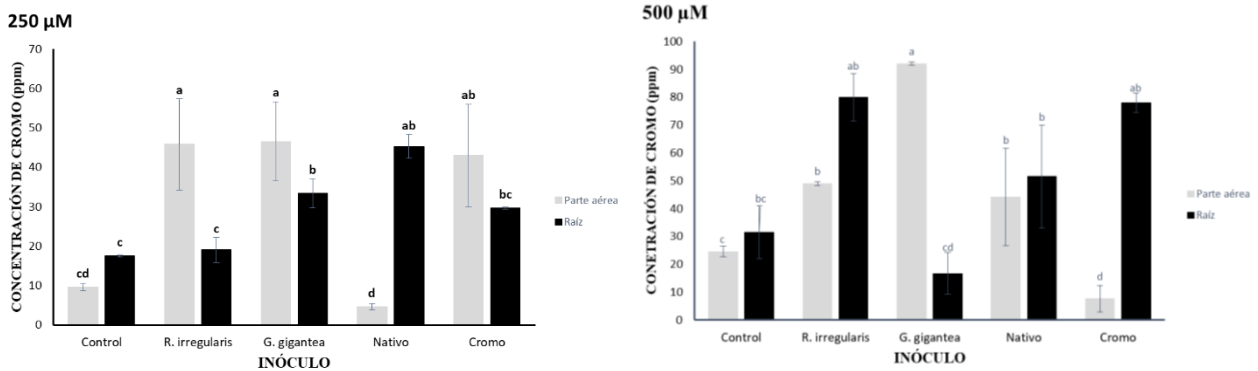


Figura 36. Comparación general de concentraciones de Cr (VI) en plantas de maíz (*Zea mays L.*).

Cada una de las especies de HMA utilizados en los tratamiento le confirió a la planta una estrategia diferente, absorbiendo el Cromo en las raíces o traslocandolo a la parte aérea, pero no le ofrece protección ya que las cantidades en los tratamientos de 250, 500 y 1000 µM fue mayor a 5 mg/kg lo cual ya es considerado como toxico (Fig. 36).

El inoculo de *G. gigantea* absorbió mayor cantidad de Cromo a 250, 500 y 1000 µM y lo traslco a la parte aérea de la planta el cual fue de 46.5, 92 y 87 ppm correspondientemente (Figura 37). Lo cual está relacionado con los resultados obtenidos en las variables agronómicas ya que estas plantas fueron las que obtuvieron menor tamaño, diámetro y ancho de Hoja (Fig. 24 y 30).



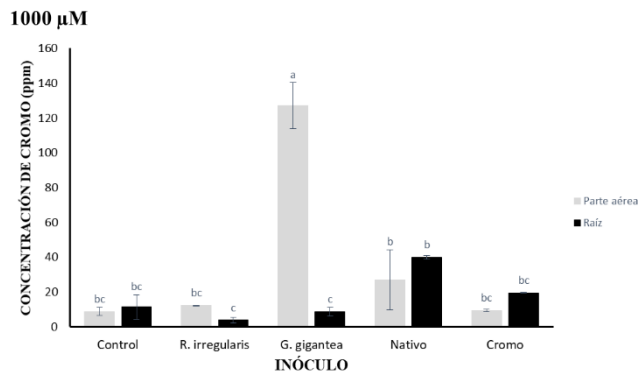


Fig. 37. Concentración de Cromo en plantas de maíz (*Zea mays L.*). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$, Tukey)

El inóculo de *R. irregularis*, el inóculo Nativo de suelo de maíz y el inóculo de suelo contaminado con Cromo absorbieron menor cantidad de Cr (IV) y lo dejaron en la raíz a concentraciones de 500 y 1000 μM . La cantidad de cromo fue mayor al inocular las plantas con HMA en comparación con el control (plantas no inoculadas).

IX. DISCUSION

La mayoría de los suelos contienen cantidades significativas de Cromo (Cr), pero su disponibilidad para las plantas es limitada. La United States Public Health Service (1997) estima que una ingesta de entre 50 y 200 $\mu\text{g}/\text{día}$ de Cr (III) es adecuada para mantener un estado óptimo de salud, pero el Cr (VI) es la forma comercial más importante y altamente tóxica para la mayoría de los organismos. La Agencia de Protección Ambiental (EPA) y la International Agency for Research on Cancer (1998) han clasificado al compuesto de Cr (VI) como carcinógeno.

El Cromo Hexavalente (VI) es la forma más biodisponible para las plantas pero la más inestable en el suelo. Los cambios de pH y los exudados radicales pueden influir el estado de oxidación del Cr y con esto se puede aumentar o disminuir la biodisponibilidad para las plantas (James, 2002). El Cr (VI) aumenta su solubilidad en rangos de pH bajo 5,5 y sobre 8. Las plantas que han crecido en suelo no contaminado contienen Cromo en concentraciones que fluctúan entre los no detectables y 0.2 mg/kg. En suelos con depósitos importantes de cromo, estas concentraciones pueden llegar alrededor de 5 – 30 mg/kg, lo cual se considera excesivo o tóxico (Kabata-Pendias, 2000).

Las plantas tienen cierto grado de tolerancia y desarrollan mecanismos celulares que pueden estar involucrados en la detoxificación de los metales pesados. Pero cuando las concentraciones de MP están fuera de los límites se genera una condición adversa para su desarrollo, provocando un desequilibrio y se desencadena el estrés oxidativo. La sensibilidad de las especies vegetales a los MP varía considerablemente a través de reinos y familias, siendo las plantas vasculares ligeramente más tolerantes (Rosa *et al.*, 1999). La captación del metal por las plantas asociadas a HMA puede variar considerablemente dependiendo el papel funcional del hongo, el tipo de planta y el metal (Gamalero *et al.*, 2008).

En este trabajo se utilizó un inóculo de *R. irregularis*, un inóculo de *G. gigantea*, un inóculo Nativo de suelos de Maíz y un inóculo autóctono de suelos contaminados con cromo.

Las plantas de maíz expuestas al Cr (VI) afectaron su desarrollo, las diferentes concentraciones de Cr (500, 1000 μM) pudieron causar un desbalance e interferir con actividades esenciales por modificación de la estructura proteica (desnaturalización proteica) o por el reemplazamiento de elementos vitales dando como resultado síntomas de deficiencia

en la planta (Hall, 2002). También se puede presentar un estrés oxidativo causado por la producción de oxígeno reactivo, debido a los niveles altos de MP y como consecuencia la planta presenta síntomas de toxicidad como clorosis y retraso del crecimiento (Vásquez *et al.*, 1987).

En este trabajo, el mayor tamaño de las plantas se presentó en los tratamientos con Cr (VI) a 250 μM lo cual reafirma lo reportado por Sinha *et al.*, (2004) referente que a bajas concentraciones de cromo existe una estimulación en la síntesis de proteína, esto debido probablemente a la inducción de las metaloproteínas, como un mecanismo de defensa tanto por parte de la planta, como de los HMA; estas proteínas conocidas comúnmente como fitoquelatinas que su principal función es quelar el metal formando un complejo metal-proteína que es transportado y almacenado en las vacuolas celulares (Cobett 2000; Rea *et al.*, 2004).

Existen reportes de que las poblaciones autóctonas de HMA de suelos contaminados con metales presentan algunas adaptaciones potenciales para soportar el estrés del metal. Weissenhorn *et al.* (1993), aislaron HM de los suelos con metales pesados los cuales era más resistentes al cadmio que otros HMA de la misma especie. Lo anterior concuerda con nuestros resultados en maíz asociado a un consorcio de HMA proveniente de suelos contaminados con 100 μM de Cromo, que tiene mayor efectividad para promover la eficiencia de la tolerancia al metal.

La simbiosis micorrícica que es considerada por algunos autores como “raíces de hongos” que se encuentran “viviendo juntos” o bien, hongos que viven en las raíces de plantas (Boucher *et al.*, 1982; Leung y Poulin, 2008), y se considera a la colonización de los HMA como una extensión funcional de las raíces de las plantas, lo cual les permite explorar una mayor área superficial aumentando el estado nutricional de sus hospederos (plantas).

Trotta *et al.*, (2006) reporta que cuando la colonización micorrícica es alta en las plantas, es posible que conlleve efectos benéficos hacia ellas al incrementar la concentración del metal; el bajo porcentaje de colonización total por HMA encontrados en las plantas de maíz en este trabajo muestran que no le proporcionaron protección a las plantas. Al utilizar una variedad de HMA, el efecto de la inoculación es variable entre las diferentes especies de plantas

(Malcova, *et al.*, 2003), probablemente porque diferentes ecotipos de HMA pueden tener diferentes grados de tolerancia a metales pesados (Leyval y Weissenhorn, 1996).

Los HMA también pueden estimular la ramificación y elongación de las raíces alimenticias, por lo que se incrementa el número total de raíces y la biomasa, lo que les permite tener una mayor capacidad de absorción y mayor tolerancia al estrés (López-Bucio *et al.*, 2003). Los resultados de este trabajo mostraron que a medida que fueron aumentando las concentraciones de Cr (VI) las raíces de las plantas inoculadas con los HMA tuvieron un desarrollo mayor de raíces secundarias, se notaron más robustas y en algunas cosas se mostró una elongación, esto se reflejó en un mayor peso seco.

Todas las plantas absorben metales del suelo donde se encuentran pero en distinto grado, dependiendo de la especie vegetal, las características y contenido en metales pesados. James y Barlett (1984), observaron que la reducción del Cr(VI), seguida de la complejación del recién formado Cr (III), en la zona radical, puede aumentar la absorción y traslocación de Cr en raíces y tallos de poroto (*Phaseolus sp.*) y maíz (*Zea mays L.*).

Los HMA pueden potencializar la absorción de MP o disminuirla, se han reportado que en algunos casos las plantas micorrizadas pueden mostrar mayor captación de metales pesados por la raíz y aumentar el transporte de estos a la parte aérea de la planta (fitoextracción) (Rabie, 2005), mientras que en otros casos el uso de HMA contribuyen a la inmovilización de los MP en las raíces de las plantas (Gaur y Andholeya, 2004) o en el suelo (González-Chávez *et al.*, 2004). Esto es comparado con los inóculos que se utilizaron en este trabajo mientras que *G. gigantea* aumento el transporte del Cr (VI) a la parte aérea, los demás inóculos lo inmovilizaron en las raíces.

Además el transporte o la inmovilización de los MP pueden estar íntimamente relacionado con la colonización interna de los HMA en las plantas de maíz, ya que existe un mayor porcentaje de presencia de Arbusculos en las plantas inoculadas con *G. gigantea* los cuales transportaron el Cromo de la parte de la raíz a la parte aérea, los Arbusculos son los responsables del transporte de nutrientes al interior de la planta y podría ser la forma que el Cr (VI) utiliza para entrar y sea traslocado al interior del tallo, mientras que para el caso de *R. irregularis* hay un mayor porcentaje en la presencia de Vesículas, las cuales son las encargadas del almacén de energía y puede que ser la manera en que el Cr se encuentra

inmovilizado en la parte de la raíz. Lo anterior concuerda con lo reportado por Gaur y Aldholeya, (2004) donde se hace referencia que la mayoría de los MP son también almacenados en las estructuras micorrícicas presentes en las raíces de las plantas y en las esporas.

Los HMA pueden aumentar la absorción de metales tóxicos y conducirlos a las plantas, con efectos fisiológicos perjudiciales para ellas, esto se debe al hecho de que las hifas extrarradicales y intrarradicales se encuentran involucradas activamente en la captación de MP, y por lo mismo los MP son transportados en todo el micelio del hongo y transferirlas a la planta hospedera, lo que puede ser un indicador de un mutualismo altamente selectivo (González-Guerrero et al., 2009). También Audet y Charest (2006, 2009, 2010, 2013), demostraron que la unión de metales con HMA puede reducir significativamente hasta el 50% la absorción del exceso de metales potencialmente dañinos, lo que reduce la carga de estrés al metal para la planta, lo cual se refleja en la salud de la misma.

Del Val *et al.*, (1999b) menciona que el total de esporas de HMA decrece cuando se aplican contaminantes y a su vez se incrementan las cantidades de metales pesados, pero que las esporas de HMA nunca desaparecen completamente del suelo surgiendo una cierta adaptación de los HMA. En este trabajo se mostró lo contrario para el caso de *G. gigantea*, ya que a medida que las concentraciones de Cr (VI) hubo un mayor porcentaje de esporas, lo cual se relación con la sobrevivencia de esta especie y de esta manera no le confirió protección a la planta, pero podría ser una opción para obtener esporas con una adaptabilidad en suelos contaminados con MP.

Esto muestra que el resultado de la micorrización de las plantas con fines de fitorremediación de suelos contaminados depende de la combinación planta-hongo-metal y está influenciado por las condiciones del suelo. Pero sin embargo el uso de los HMA es un complemento para la biorremediación de suelos contaminados con MP. Nuestros resultados mostraron que el maíz asociado a los HMA podría ser una estrategia para la remoción del Cromo total, y como se observó en los tratamientos empelados, aunque los HMA no le confirieron protección a las plantas de maíz, estos pueden ser utilizados para fitoextraer o fitoinmovilizar el Cr.

X. LITERATURA CITADA

- Regvar , M., Bothe, H., & Hildebrandt, U. (2007). Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochem.* 68, 139-146.
- Adriano. (1986). *Trace elements in the terrestrial environment*. New York: Springer-Verlag.
- ALVARADO, J., DASGUPTA–SCHUBERT, N., AMBRIZ, E., SÁNCHEZ–YAÑEZ, J., & VILLEGAS, J. (2011). Hongos micorrízicos arbusculares y la fitorremediación de plomo. *Rev. Int. Contaminación Ambiental*, 27.
- Armienta-Hernández, M., & Rodríguez-Castillo, R. (1995). Environmental exposure to chromium compounds in the valley of León, México. *Environmental Health Perspectives*, 103, 47-51.
- Bainard, L. J., Klironomos, & Gordon, A. (2011). The mycorrhizal status and colonization of 26 tree species growing in urban and rural environments. *Mycorrhiza* 21, 91–96.
- Bartlett, R. J., & James, B. R. (1979). Behavior of Chromium in Soils (III) Oxidation. .
- Bastida García , R. A., & Sánchez Reyes, A. (2009). Fitorremediación de metales pesados y microorganismos. *Medio Ambiente y Desarrollo; Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente*, ISSN-1683-8904.
- Batista Garcia, R. A., & Sanchez Reyes, A. (2009). Heavy metals phytoremediation and microorganisms. *Revista electronica de la Agencia de Medio Ambiente*(16).
- Bautista Zuñiga, F. (1999). *Introducción al Estudio de la contaminación del suelo por metales pesados*. Merida, Yucatán, México: Universidad Autónoma de Yucatán.
- Becerril, et al. (2007). Especies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación. *Ecosistema*.
- Bernal, et al. (2007). Aplicación de la fitorremediación a los suelos contaminados por metales pesados en Aznalcóllar. *Ecosistema*, 68-82.
- Calder, L. M. (1988). Chromium contamination of groundwater. In: *Nriagu, J.O., Nieboer, E. (Eds.), Chromium in Natural and Human Environments, (Wiley Interscience, New York)*, 215-231.
- Carreón-Abud, Y., Beltrán-Nambo, M., & Martínez Trujillo, M. (2013). Efecto Protector de los hongos micorrízicos arbusculares en plantas de jitomate (*Solanum Lycopersicum*), expuesta a Cr(VI). *Internacional de botánica experimental*, 82, 127-134.
- Carrón Abud Y, e. a. (2013). *Hongos Micorrízicos Arbusculares: Conservación y Bioinoculantes*. Morelia, Michoacan, México: Printen in México.

- Cervantes, C. G.-G. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS. Microbiol.Rev.*, 25, 335-347.
- Cicerone , D. S., Sánchez, P., & Paula, R. S. (2006). Contaminación y medio ambiente. *Eudeba*, 210.
- Davies, F., Puryear, J., Newton, R., Egilla, J., & Grossi, J. (2002). Mycorrhizal fungi increase chromium uptake by sunflower plants: Influence on tissue mineral concentration, growth, and gas exchange. *J. Plant Nutr.*, 25, 2389-2407.
- Delgadillo-López et al., A. E. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 597-612.
- Demostrables, J., & Scanlon, M. J. (2009). Maize (*Zea mays*): A model organism for basic and applied research in plant biology. *Cold Spring Harb. Protoc.* doi:10.1101/pdb.emo132.
- Dorronsoro Fernandez, C. (2007). Edafología y química agrícola.
- Epstein, E., & Bloom, A. (2005). *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*. (Segunda edición ed.). USA: Sinauer.
- García , I., & Dorronsoro, C. (2005). *Contaminación por metales pesados*. Obtenido de Tecnología de Suelos. Universidad de Granada. Departamento de Edafología y Química Agrícola.: <http://edafología.ugr.es/conta/tema15/introd..htm>
- Garcías, C., Hernandez, T., Moreno, J. L., & Roos, M. (2003). Actividad microbiana en suelos del sureste español sometidos a procesos de degradación y desertificación. *Investigación y Perspectivas de la Enzimología de Suelos*, 43-146.
- González-Alejandre , M. (2016). *Captación y Movilización del cromo en plantas de maíz (Zea mays) en suelo suplementado con Nutriente Minerales*. Morelia Michoacan: Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.
- González-Chávez, M. A. (2005). Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismo rizofericos. *Terra Latinoamericana*, 23, 29-37.
- González-Guerrero, M. (2005). *Estudio de los mecanismos implicados en la homeostasis de metales pesados en el hongo formador de micorrizas arbusculares Glomus intrarradices*. Granada, España.: Tesis de doctorado. Universidad de Granada.
- Gough. (1993). Understanding our fragile environment, lessons from geochemical studies. *United States Government Printing Office. Washington, DC*, 115.
- Guerrero, E. (1996). Micorrizas: Recurso biológico del suelo. *Fondo FEN*.
- Hamel, C., & Plenchette . (2007). Mycorrhizae in crop production. *Haworth Press*.

- Handa, B. K. (1988). Occurrence and distribution of chromium in natural waters of India. *In: Nriagu, J.O., Nieboer, E. (Eds.), Chromium in Natural and Human Environments, (Wiley Interscience, New York), 189-215.*
- Huffman, E., & Allaway, W. (1973). Chromium in plants: Distribution in tissues, organelles, and extracts and availability of bean leaf Cr to animals. *J. Agr. Food Chem, 21, 982-986.*
- Husband, R. E. (2002). Temporal variation in the arbuscular mycorrhizal communities colonizing seedlings in a tropical forest. *FEMS Microbiol. Ecol. 42, 131-136.*
- Khan, A. G. (2001). Relationships between chromium biomagnification ratio, accumulation factor, and mycorrhizae in plants growing on tannery effluent-polluted soil. *Environ. Int, 26, 417-423.*
- Liedgens, M., Soldati, A., Stamp, P., & Richner, W. (2000). Root development of maize (*Zea mays* L.) as observed with minirhizotrons in lysimeters. *Crop Sci 40, 1665-1672.*
- Maqueda, A. P. (2003). Fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados. *Tesis de Opción a Maestría en Biotecnología.*
- Moreno Grau, M. D. (2003). Metales: Zinc. En: Toxicología Ambiental: Evaluación del riesgo para la salud humana. Madrid. *McGraw-Hill, 212-214.*
- Navarro-Aviñó, J. P., Aguilar Alonso, I., & López-Moya, J. R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas 16 (2), 10-25.*
- Navas, A., & Lindhorfer, H. (2003). Geochemical speciation of heavy metals in semiarid soils of the central Ebro Valley (Spain). *Environment International, 29, 61-68.*
- Negretti de Bratter V, M. (1995). Minerales y Oligoelementos. Aspectos generales. *Fundación Berterbmann, 3-13.*
- Ortiz-Castro, R. (2005). Modificaciones en la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L. por efecto del cromo. 74.
- Pinzón, L., Rodríguez, J., & Giraldo, E. (1995). Interacción de los metales pesados Cr, Cd, Pb, Ni entre el sedimento y la columna de agua en el caso del río Bogotá. *Universidad de los Andes(222).*
- Powell, J.R., et al. (2009). Phylogenetic trait conservatism and the evolution of functional trade-offs in arbuscular mycorrhizal fungi. *Proc. R. Soc. B 276, 4237-4245.*
- Ramírez-Díaz, M. I., Riveros-Rosas, H., Campos-Garcías, J., & Cervantes, C. (2009). Reducción bacteriana de cromo hexavalente: mecanismos y aplicaciones. *REB 28(3), 73-79.*

- Ross, S. (1994). Toxic metals in soil-plant systems. En S. Ross, *Sources and forms of potentially toxic metals in soil-plant systems* (págs. 3-25). Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons.
- Serralde, A. M. (2004). Análisis de poblaciones de micorrizas en maíz (*Zea Mayz L.*) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos. *Revista Corpoica* 5 (1), 31-40.
- Sotelo-Muñoz, A. P. (2012). Especiación de cromo en la solución del suelo de tres suelos enmendados con biosólidos bajo diferentes condiciones oxidoreductoras.
- Spain, A. (2003). Implications of microbial heavy metals tolerance in the environment. *Undergraduate research*, 6, 1-6.
- Sylvia, D. e. (2005). Principles and applications of soil microbiology. *Pearson-Prentice Hall*.
- Unz , R. F., & Shuttleworth., K. L. (1996). Microbial mobilization and immobilization of heavy metals. *Environ. Biotechnol.*, 7, 307-310.
- Wallace, A. S. (1976). Some effects of chromium toxicity on bush bean plants grow in soil. *Plant and Soil*, 44, 471-473.
- Wang, J., & Chen. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol. Adv* 27, 195-226.
- Zayed, A. M., & Terry, N. (2003). Chromium in the evironment: factors affecting biological remediation. *Plant and soil*, 249, 139-159.