

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POST-GRADO**



**RESPUESTAS BIOLÓGICAS DE PLANTAS SUPERIORES A LA
EXPOSICION DE ALTAS CONCENTRACIONES DE METALES PESADOS**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON
ESPECIALIDAD EN BOTÁNICA**

PRESENTA:

JORGE LUIS HERNANDEZ PIÑERO

CIUDAD UNIVERSITARIA

JUNIO 2001



1080124466



UANL

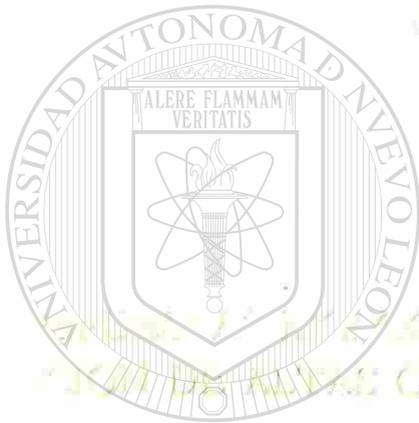
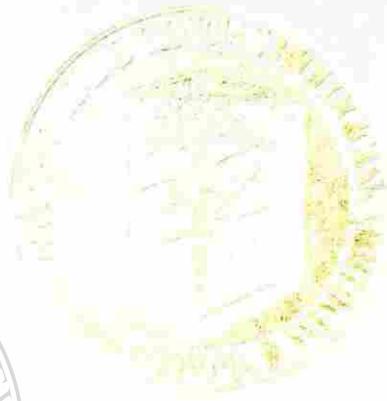
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN DE INSTITUTOS DE POST-GRADO



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

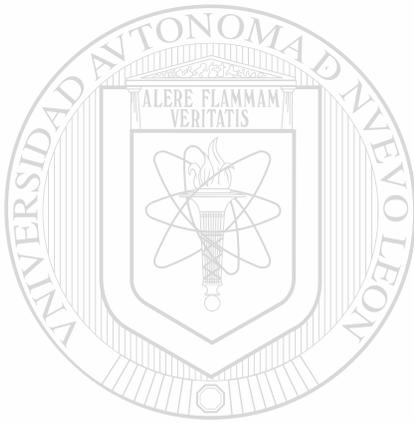
QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON
ESPECIALIDAD EN BOTÁNICA

PRESENTA:

JORGE LUIS HERNÁNDEZ PINERO

TD
QK 753
- P5
H4
2001



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**RESPUESTAS BIOLÓGICAS DE PLANTAS SUPERIORES A LA
EXPOSICIÓN DE ALTAS CONCENTRACIONES DE METALES PESADOS**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
CON ESPECIALIDAD EN BOTÁNICA**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PRESENTA

JORGE LUIS HERNÁNDEZ PIÑERO

CIUDAD UNIVERSITARIA, JUNIO 2001.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



RESPUESTAS BIOLÓGICAS DE PLANTAS SUPERIORES A LA EXPOSICION
DE ALTAS CONCENTRACIONES DE METALES PESADOS

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ESPECIALIDAD EN BOTANICA

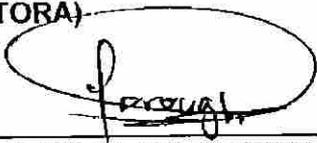
PRESENTA

JORGE LUIS HERNANDEZ PIÑERO

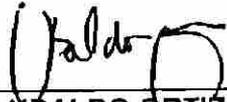
COMISION DE TESIS:


DRA. MARIA JULIA VERDE STAR
PRESIDENTE (DIRECTORA)


DRA. GRACIELA GARCIA DIAZ
ASESOR (SECRETARIO)


DR. RAHIM FOROUGHBAKHCH P.
ASESOR (PRIMER VOCAL)


DRA. HILDA GAMEZ GONZALEZ
ASESOR (SEGUNDO VOCAL)


DR. UBALDO ORTIZ MENDEZ
ASESOR (TERCER VOCAL)

CIUDAD UNIVERSITARIA, JUNIO DE 2001

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



RESPUESTAS BIOLÓGICAS DE PLANTAS SUPERIORES A LA EXPOSICION
DE ALTAS CONCENTRACIONES DE METALES PESADOS

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ESPECIALIDAD EN BOTANICA

PRESENTA

JORGE LUIS HERNANDEZ PIÑERO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

BAJO LA DIRECCIÓN DE
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS


DRA. MARIA JULIA VERDE STAR
DIRECTORA


DR. RATIKANTA MAITI
DIRECTOR EXTERNO

CIUDAD UNIVERSITARIA, JUNIO DE 2001

Dedicatoria

A Romelia, mi muy amada esposa

A Naomi, Jorge y Román, mis muy queridos hijos

Quienes son la razón de mi existir

*Para ustedes es mi corazón y mi amor
Para mí son sus sonrisas y alegrías*

A Román y Carmen Antonia

Dígnos ejemplos de dedicación y amor

*A Iván, Román, Gonzalo, Gerardo, Carlos,
Rebeca y Alejandro.*

A mi Dios paciente y misericordioso, te amo

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. María Julia Verde Star**, por sus acertados comentarios en la dirección de esta tesis, por su gran ayuda en esta etapa de superación personal.

Al **Dr. Ratikanta Maiti**, por sus valiosas aportaciones, por enseñarme aquellas cosas que no salen en los libros, por su confianza en mí; pero sobre todo por ofrecerme su sincera amistad.

A la **Dra. Hilda Gámez González**, por su muy meticulosa revisión del manuscrito y ejemplo de gusto y responsabilidad por su trabajo

Al **Dr. Rahim Foroughbakhch**, por su paciente asesoría, especialmente en lo concerniente a los análisis estadísticos.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A la **Dra. Graciela Díaz**, por sus valiosa ayuda al facilitar la asesoría, equipos analíticos empleados y sus comentarios para mejorar la presente investigación.

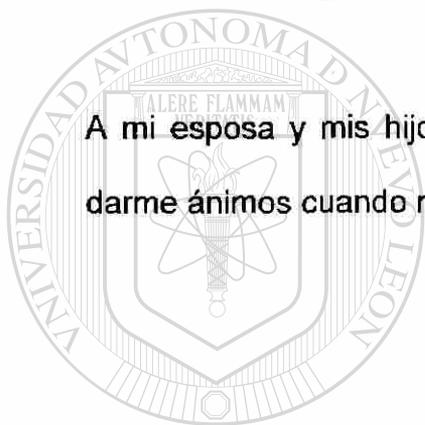
Al **Dr. Ubaldo Ortiz**, por sus acertados comentarios y por haber estado siempre dispuesto a ayudar durante la realización de este trabajo.

A la Dras. **Adriana Núñez** y **María Luisa Cárdenas** por haber estado siempre conmigo durante el transcurso del Doctorado como compañeras y amigas.

A MC **Guadalupe Almanza**, MC **Ma. Concepción Valadez** y el Dr. **Sergio Moreno** por su gran ayuda.

A los estudiantes **Eliza**, **Viviana**, **Yessi**, **Janneth**, **Caro** y **Giovanni** quienes me brindaron su alegría mientras de alguna forma ayudaron en este trabajo.

A mi esposa y mis hijos por haber también sacrificado parte de su tiempo y darme ánimos cuando más los necesité.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONTENIDO

PAGINA

RESUMEN

1

ABSTRACT

3

INTRODUCCION

5

OBJETIVOS

7

REVISION DE LITERATURA

9

METODOLOGIA

20

RESULTADOS

37

DISCUSION

75®

CONCLUSIONES

90

LITERATURA CONSULTADA

92



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Con el fin de seleccionar especies tolerantes a la exposición de metales pesados que puedan ser potencialmente útiles en técnicas de depuración de suelos contaminados se realizó esta investigación en dos tipos de plantas: silvestres y cultivadas.

Primero se determinó el contenido mineral en plantas herbáceas silvestres colectadas en áreas visiblemente contaminadas mediante espectrometría de emisión de plasma acoplado, en las cuales, destacó la presencia de elevadas concentraciones de Pb, Al y Fe en los tejidos de *Malva parviflora*. Con fines de propagación de esta especie en medios contaminados se realizaron diversas pruebas de germinación, las cuales, resultaron negativas al no poder romper el letargo de las semillas. Debido a ello, se sometió a esta especie a pruebas de tolerancia al Pb y Cd en medio inerte observándose una capacidad de tolerancia alta para el primero, aunque nula para el segundo.

Para estudiar el nivel de tolerancia al Pb se sometieron las plantas cultivadas *Medicago sativa* L., *Avena sativa* L. y *Lolium multiflorum* Lam. a soluciones de $Pb(NO_3)_2$ 1000 y 5000 ppm Pb. Asimismo, las especies *Medicago sativa* L., *Avena sativa* L., *Phaseolus vulgaris* L. var. pinto americano y *P. vulgaris* L. var. negro se sometieron a soluciones de 200, 600, 1200 y 2000 ppm de Pb disuelto con EDTA en medio nutritivo de Hoagland pH 5.5 y en soluciones de 130, 260 y 390 ppm de Cd en el mismo medio para estudiar su nivel de tolerancia y ciertas respuestas biológicas. A concentraciones de 200 ppm Pb en el sustrato, las

plantas incrementaron la producción de biomasa, la concentración de clorofila y el contenido de proteína total. Sin embargo a concentraciones mayores de 600 ppm Pb estas variables, excepto la proteína total, disminuyeron a niveles por debajo de los controles. La acumulación de Pb tisular ocurre en forma proporcional con el contenido metálico en el sustrato. El Pb en medio acuoso sin solución nutritiva de Hoagland es absorbido por la planta en una proporción mucho mayor que cuando se suministra disuelto con EDTA en la solución nutritiva. No obstante, en esta última el Pb absorbido se acumula mayormente en las partes aéreas de la planta que en la raíz. Las especies de avena, alfalfa y frijol poseen una capacidad similar de acumular Pb. Sin embargo, debido al inicio de respuestas biológicas desfavorables en las concentraciones mayores utilizadas, como la disminución de biomasa y clorofila, se recomienda su uso con fines de fitorremediación sólo en rangos menores de 1000 ppm Pb.

Con respecto a las plantas cultivadas sometidas a Cd, se encontró que la avena es la que mayor capacidad de absorción y acumulación posee, seguida de la alfalfa y las dos variedades tratadas de frijol. Sin embargo, el Cd absorbido es retenido principalmente en la raíz por lo que su utilización quedaría restringida a estrategias de fitoestabilización únicamente.

Se recomienda mayor investigación para propagar especies silvestres con fines de fitorremediación en etapa joven y que se tomen las precauciones necesarias para evitar el consumo alimenticio de las especies cultivadas en ganado y humanos si se llegaran a utilizar en proyectos de fitorremediación.

ABSTRACT

In order to select species being tolerant to the exposure of heavy metals and potentially useful in techniques for the depuration of contaminated soils this investigation was realized under two kinds of plants: wild and cultivated.

First the content of heavy metals was determined in herbaceous plants collected from noticeably contaminated areas through Induced Coupled Photospectrometry (ICP). In these analysis the presence of high concentration of Pb, Al and Fe in the tissues of *Malva parviflora*. With the object to propagate this species in polluted soils diverse germination tests were applied which resulted negative for the reason that we could not break the seed dormancy. In consequence, this species was subjected to some Pb and Cd tolerance assays in inert medium observing a high tolerance capacity for the former and none capacity for the latter.

To study the tolerance level to Pb the cultivated plants *Medicago sativa* L., *Avena sativa* L. and *Lolium multiflorum* Lam. were subjected to solutions of 1000 and 5000 ppm Pb. Likewise, the species *Medicago sativa* L., *Avena sativa* L., *Phaseolus vulgaris* L. var. pinto americano y *P. vulgaris* L. var. negro were subjected to solutions of 200, 600, 1200 and 2000 ppm of Pb dissolved with EDTA in Hoagland nutriments medium pH 5.5 and solutions of 130, 260 and 390 ppm of Cd in the same medium in order to study their tolerance level and certain biological responses. At concentrations of 200 ppm Pb in the substrate the cultivated plants increased the biomass production, chlorophyll concentration

and the total protein contain. However, at higher concentrations of 600 ppm Pb these variables, except for the total protein, decreased to levels below controls. The accumulation of Pb in tissues occurred in proportion to the metallic content in the substrate. Pb administered in aqueous solution without Hoagland medium constituents is absorbed by the plant in a higher proportion than when Pb is administered dissolved with EDTA in Hoagland solution. Nevertheless, in the latter the absorbed Pb is accumulated in the aerial parts of the plant in a higher proportion than in the roots. The species of oat, alfalfa and bean have a similar ability to accumulate Pb. However, owed to the onset of biological unfavorable responses at the higher concentrations used here, as the decline in biomass and chlorophyll production, these species could be utilized for phytoremediation purposes only at ranges lesser than 1000 ppm Pb.

With respect to the cultivated plants subjected to Cd it was found that the oat plants had the highest absorption and accumulation capacity followed by alfalfa and the two treated bean varieties. However, Cd is restrained mainly in the roots of these species so their utilization would be reserved only for phytostabilization strategies only.

It is recommended the development of further investigations to propagate wild species for phytoremediation purposes as well as to take the precautionary measures against the consumption of cultivated species by cattle and humans if they are utilized in phytoremediation projects.

INTRODUCCION

Uno de los principales problemas de hoy en día es la contaminación del suelo y sus efectos adversos en el medio ambiente. Esta contaminación puede ocurrir por diferentes vías, entre ellas las operaciones industriales, como las emisiones, fugas y derramas accidentales, descargas de efluentes y residuos. Estas operaciones involucran frecuentemente mezclas complejas de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos, entre los que destacan los metales pesados, como el Plomo y el Cadmio.

Los daños que la contaminación causa en el ambiente pueden ser a corto o largo plazo, dependiendo del tipo de contaminante, su distribución, la concentración y las características hidrogeológicas del suelo. La persistencia por largo tiempo de grandes concentraciones de metales pesados en el suelo es un factor que incrementa el riesgo de daño ambiental debido a su infiltración en los mantos freáticos y la exposición en plantas y animales que habitan en el suelo, lo cual genera que los mismos se biomagnifiquen en los distintos niveles tróficos (Fernández et al., 1998).

En una gran cantidad de lugares es común observar vegetación creciendo normalmente en ambientes conteniendo moderadas concentraciones de compuestos contaminantes peligrosos en el suelo. Existen estudios que han comprobado el papel de la vegetación en los procesos de biotransformación y estabilización de formas químicas complejas a compuestos energéticamente

más estables en el ambiente (Shimp et al, 1993). Estos estudios permiten dilucidar que hay suficientes razones para investigar las interacciones que ocurren entre los compuestos químicos residuales peligrosos, microorganismos, plantas, suelo, aire y agua. En este sentido, el conocimiento de las respuestas fisiológicas y bioquímicas de la planta a la alta exposición de contaminantes sin que se generen en ella efectos tóxicos notables que alteren su normal funcionamiento nos ayudaría a elaborar diferentes estrategias de saneamiento y mejoramiento ambiental mediante el empleo de especies vegetales que toleren las condiciones ambientales y el contenido o concentración de contaminantes presentes.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

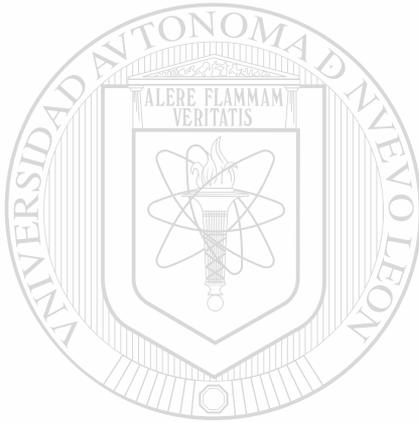
OBJETIVO GENERAL

Determinar el uso potencial de algunas plantas silvestres y cultivables adaptadas a condiciones climáticas extremas como especies fitorremediadoras de suelos contaminados en respuesta a la exposición de elevadas concentraciones de metales pesados.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el contenido de metales pesados en plantas colectadas en diferentes puntos del área metropolitana de Monterrey que presenten signos visibles de contaminación industrial para determinar si son acumuladoras de metales pesados en sus tejidos mediante técnicas de espectrometría por emisión de plasma acoplado.
2. Determinar bajo condiciones controladas en el laboratorio el nivel de tolerancia al Plomo y Cadmio de las plantas silvestres colectadas que acumulen gran concentración de metales pesados en su interior.

3. Estudiar el nivel de tolerancia y las respuestas biológicas generadas por exposición a elevadas concentraciones de Plomo y Cadmio en *Medicago sativa* L., *Avena sativa* L., *Lolium multiflorum* Lam., *Phaseolus vulgaris* L. var. pinto americano y *P. vulgaris* L var. negro mediante el análisis de su capacidad germinativa, crecimiento, elongación de la raíz, formación de biomasa, contenido de clorofila (α , β y total), concentración de proteína cruda total, contenido de metales pesados y ultraestructura celular.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

REVISION DE LITERATURA

RESPUESTAS BIOLÓGICAS Y MECANISMOS BIOQUÍMICOS

Conociendo las respuestas biológicas y los mecanismos de tolerancia de algunas plantas a la exposición de metales pesados sin generación de efectos nocivos en su fisiología, se pueden crear sistemas estratégicos de depuración de suelos contaminados mediante la utilización y manipulación de sus componentes botánicos para obtener mejores rendimientos en cuanto a la absorción de metales pesados y hacer de ésta una tecnología que sea factible y ventajosa de aplicar.

En plantas sensibles estas respuestas se resumen en la inhibición de enzimas involucradas en las reacciones fotosintéticas (Bhardwaj y Mascareñas, 1989; Singh et al, 1997). Afortunadamente, existen grupos de plantas cuyas respuestas consisten en la inducción de peroxidasas y enzimas del metabolismo intermediario que de alguna manera intervienen en los procesos que generan tolerancia al estrés metálico (Assche et al, 1990).

La contaminación de suelos con metales pesados o micronutrientes en concentraciones fitotóxicas generan efectos adversos no solo a las plantas que allí habitan sino a toda la ecología del lugar e incluso sus efectos pueden llegar a generar riesgos de salud en los humanos.

Algunas poblaciones vegetales pueden ser capaces de colonizar ambientes con alto contenido de metales pesados y acumularlos en sus tejidos en cantidades

considerables. La hiperacumulación de metales pesados es una adaptación ecofisiológica de plantas que han evolucionado en suelos metaliníferos (Shaw, J. 1990; Maywald, 1997).

El interés en estudiar los mecanismos de tolerancia de las plantas a altas concentraciones de metales pesados proviene en gran parte para su aplicación en técnicas de fitorremediación con las cuales se extraen contaminantes metálicos del suelo (Chaney et al, 1997).

Las estrategias que presentan las plantas superiores para tolerar la exposición a elevadas concentraciones de metales pesados se pueden agrupar en dos categorías:

1) Exclusión:

- a) Formación de complejos bioquímicos en el medio externo o en las paredes y membranas celulares más externas de la planta.
- b) Precipitación del metal en el exterior mediante secreciones de mucílagos y otros compuestos orgánicos.
- c) Alteración de los sistemas membranosos de transporte para reducir la entrada del metal.
- d) Incremento en la actividad de ciertas bombas de iones.

2) Inclusión y acumulación:

- a) Secuestro en el interior en lugares donde no haya efecto tóxico, como en la vacuola y paredes celulares.

- b) Destoxificación interna del metal mediante su incorporación a proteínas y péptidos ricos en grupos tiólicos (—SH)
- c) Reacciones de óxido-reducción que cambian el estado reactivo del metal a formas menos tóxicas.

Los mecanismos de tolerancia a la acumulación de metales pesados en eucariotes son pobremente entendidos. Estos involucran el secuestro extracelular e intracelular de los metales por agentes bioquímicos, su precipitación, compartimentalización y translocación al sistema (Maywald y Weigel, 1997).

Para llevar a cabo estos procesos la célula se vale de estrategias específicas y así minimizar los efectos tóxicos que se puedan generar. Dentro de estos mecanismos se puede contar la liberación de mezclas complejas de compuestos orgánicos por parte de las células de la raíz que permitan cambiar

el estado químico del metal, por ejemplo pasar el ión hierro de la forma férrica a ión ferroso. Los exudados de la raíz juegan un papel importante en los fenómenos radiculares relacionados con la nutrición mineral y en la defensa contra microorganismos patógenos. En el caso de los exudados que se enlazan a metales, éstos se denominan en su conjunto como fitometalóforos, siendo los sideróforos, los cuales se enlazan con el hierro, los más ampliamente conocidos. Sin embargo, su probable papel en la toma de otros metales pesados no es conocido. Es probable que los fitometalóforos cambien las

condiciones de biodisponibilidad del metal por parte de la planta haciéndolo más o menos soluble a las membranas radiculares.

Un grupo un poco más estudiado como compuestos bioquímicos que intervienen en las respuestas fisiológicas de las plantas a la exposición a metales pesados es el de las proteínas que son capaces de enlazarse con los metales y formar así complejos bioquímicos llamados metalotioneínas, metaloenzimas y fitoquelatinas. Otras proteínas capaces de enlazar metales son algunas proteínas de almacenamiento de metales, transportadores y proteínas de canales iónicos membranosos.

Metalotioneínas

Las metalotioneínas constituyen una superfamilia de metaloproteínas y metalopéptidos de bajo peso molecular ricos en cisteína responsables de la regulación del suministro intracelular de los micronutrientes esenciales zinc y

cobre y de proteger a la célula de los efectos nocivos de concentraciones elevadas de estos iones y de otros metales pesados tales como el cadmio, mercurio, plomo, etc. Las metalotioneínas fueron reportadas por primera vez por Margoshes y Vallee (1957) en la corteza renal equina como una proteína que enlaza cadmio. Hoy día las metalotioneínas se han reportado en todos los phylum animales examinados, así como en ciertos hongos, plantas y cianobacterias.

Las metalotioneínas han sido clasificadas empíricamente en 3 clases (Fowler, et al., 1987 y Kojima, 1991). La clase I incluye todas las metalotioneínas cuyos

residuos de cisteína se colocan en posiciones parecidas a la presentada en la metalotioneína equina y otros mamíferos. La clase II son metalotioneínas proteináceas que no tienen ninguna relación con la anterior. La clase III son polipéptidos atípicos compuestos de unidades γ -glutamil-cisteína. Sin embargo, debido a que esta clasificación no se rige por patrones de similitud estructural, nuevas clasificaciones se han estado proponiendo para el futuro (Binz y Kagi, 1999) que toman en cuenta las similitudes estructurales en cuanto a la composición de aminoácidos, longitud de las secuencias de residuos, posición de los grupos de cisteína y sitios activos o funcionales, así como relaciones filogenéticas.

Fitoquelatinas

Las fitoquelatinas son una familia de péptidos de bajo peso molecular involucrados en la acumulación, detoxificación y metabolismo de ciertos metales pesados, como el Cd, Zn, Cu, Pb and Hg en las células vegetales.

Estos compuestos han sido llamado de diferentes formas:

1. Cadistinas (de *Schizosaccharomyces pombe*)
2. Péptidos Poli-(γ -EC)_nG
3. Péptidos enlazadores de Cadmio
4. Fitoquelatinas (FQ)

Las FQ han sido aisladas a partir de tejidos y cultivos vegetales en suspensión, pudiéndose determinar su constitución química, consistente en:

$(\gamma\text{-glutamilcisteina})_n\text{-glicina}$ o $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$

donde n va de 2 a 11 unidades repetitivas.

Estos compuestos están clasificados dentro de las metalotioneínas clase III y son sintetizados enzimáticamente, al contrario de las metalotioneínas clase I y II que son codificadas genéticamente. (Kagi 1991).

Inducción y síntesis de fitoquelatinas

Las fitoquelatinas aparecen por inducción al exponer a las plantas con cualquiera de los metales pesados de la tabla periódica de los elementos ($Z=29$ a 83). Esta inducibilidad aparece en una gran variedad de organismos autótrofos, incluyendo monocotiledóneas, dicotiledóneas, gimnospermas y algas (Grill et al. 1992), así como en algunas especies de hongos (Mehra et al. 1988, Kneer et al. 1992), mientras que se encuentran ausentes en los animales. Sin embargo, no siempre la FQ se enlaza al metal inductor. En *Rubia tinctorum*

las FQ son inducidas por gran cantidad de metales pesados, aunque la proteína sólo es capaz de enlazarse a la Plata, Cadmio y Cobre.

En algunas especies del orden Fabales (frijol) y en la familia Poaceae (maíz), las FQ contienen β -alanina, serina o ácido glutámico en su extremo terminal en lugar de glicina. A este tipo de FQ aberrante se le ha llamado iso-FQ.

Algunos estudios han demostrado que la biosíntesis de FQ procede luego de la activación metálica de un constituyente enzimático que utiliza glutatión como sustrato (Steffens et al. 1986; Reese and Wagner 1987; Scheller et al. 1987; Grill 1989; Howden and Cobbett 1992). Esta enzima es una γ -glutamilcisteina

dipeptidil transpeptidasa, mejor conocida simplemente como FQ sintetasa. Esta enzima cataliza la transpeptidación del residuo γ -Glu-Cys del glutatión dentro de otra molécula de glutatión inicialmente para formar una FQ de $n=2$, pudiéndose continuar la reacción de incubación hasta formar oligómeros de hasta $n=11$. La actividad de la FQ sintetasa ha sido estudiada en sistemas vegetales *in vitro* observándose que la enzima permanece activa hasta que la cantidad presente de metal sea quelada completamente por la FQ o por la adición de agentes quelantes al medio, tales como EDTA (Loeffler et al. 1989).

Acción protectora de las fitoquelatinas

La vacuola de la célula vegetal es el compartimiento de almacenamiento transitorio de estos péptidos, en donde probablemente se disocian liberando así al metal en el espacio vacuolar, mientras que el péptido disociado se degrada.

Al secuestrar de este modo al metal pesado intracelular se le confiere protección a las enzimas sensibles al metal. Se ha logrado determinar en cepas mutantes de *S. pombe* la presencia de un gen, el HMT1, que codifica una proteína localizada en el tonoplasto o membrana vacuolar y es responsable por el transporte del complejo FQ-Cd hacia el interior de la vacuola (Ortiz et al. 1992; Ortiz et al. 1995).

El aislamiento de una variedad mutante de *Arabidopsis thaliana* deficiente en FQ sintetasa ha demostrado fehacientemente el papel esencial de las FQ en la impartición de las propiedades tolerantes a metales pesados ya que la variedad original de *A. Thaliana* tolerante al Cd pasó a ser sensible al metal. Asimismo, la

sobre-exposición del gen responsable de la enzima glutatión sintetasa de *E. Coli* implantado en plantas de mostaza india ha conllevado al incremento notorio de la tolerancia al Cd en esta especie, debido en parte a un aumento en la producción de FQs. Por otro lado, la FQ sintetasa puede ser inhibida por el compuesto químico butionin sulfoximicina, generando así células que muestran ser sensibles al Cd (Steffens, et al, 1986).

FITORREMEDIACION

El término fitorremediación combina la palabra griega "phyton" (planta) con el vocablo latino "remediare" (remediar) para describir una técnica ecológica que emplea especies vegetales para eliminar, degradar o retener compuestos contaminantes en el suelo, aguas residuales y corrientes acuáticas superficiales o subterráneas. Esta técnica puede ser potencialmente utilizada en la remoción de compuestos orgánicos e inorgánicos, tales como pesticidas, solventes, componentes químicos de explosivos, hidrocarburos, sustancias aromáticas, metales pesados e isótopos radiactivos.

Para que esta técnica funcione los contaminantes deben estar en contacto directo con la planta, esencialmente a través de la rizósfera. En este ambiente una gran cantidad de compuestos pueden ser:

1. rápidamente biodegradados por la abundante población microbiana allí presente

2. unidos o precipitados en las raíces
3. absorbidos hacia las partes interiores de la planta donde son acumulados o metabolizados.

Con respecto a este último punto es necesario señalar que aunque muchos compuestos orgánicos pueden ser metabolizados por las enzimas de las plantas, los metabolitos generados pueden ser de igual, mayor o menor toxicidad, por lo que son también metabolizados hasta obtener compuestos más estables.

Ventajas de la fitorremediación

Esta novedosa tecnología está siendo cada vez más utilizada en la rehabilitación de sitios contaminados con metales pesados y compuestos orgánicos tóxicos debido a que, comparado con otras alternativas tecnológicas

de remoción de contaminantes, tiene la ventaja de poder realizarse *in situ*, a un menor costo y esfuerzo laboral, sin producir daños mayores al ecosistema, con una perturbación mínima del ambiente y buena aceptación en las comunidades.

Por el contrario, los métodos tradicionales de ingeniería de depuración de suelos generalmente consisten en tratamientos que no solamente son más costosos, sino que dejan al suelo infértil durante años (Chaney et al, 1997).

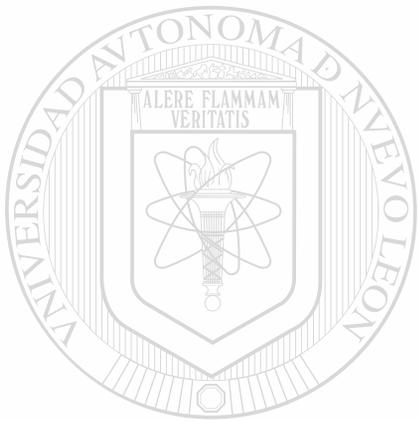
Tipos de fitorremediación

Para la aplicación de esta técnica se necesitan plantas superiores que sean tolerantes a la exposición de altas concentraciones de los elementos

contaminantes presentes en el suelo. Según sea el mecanismo de tolerancia de dichas plantas, éstas se podrán utilizar en diversas estrategias de fitorremediación de contaminantes metálicos:

1. **Fitoextracción**, también llamada **fitoacumulación**, en la cual, los metales contaminantes del suelo son absorbidos, transportados y acumulados en las partes aéreas de la planta. Luego de que las plantas se dejan crecer en el sitio por un tiempo, se cosechan y se procesan para su disposición final o recuperación y reciclado del metal. Este procedimiento se puede repetir varias veces hasta que los niveles metálicos en el suelo lleguen a límites permisibles. Si las plantas cosechadas son incineradas se reduciría el volumen de material de desecho en más del 90% de lo que se generaría si se removiera la capa de suelo contaminado y se enviara a algún relleno sanitario.
2. **Rizofiltración**, que se refiere a la captura por absorción o precipitación en la rizósfera de contaminantes que están en solución en el medio acuoso o efluentes circundante a la raíces. Esta estrategia es parecida a la fitoextracción, sólo que se utiliza en los cuerpos de agua superficial en lugar del suelo.
3. **Fitoestabilización**, mediante el uso de especies capaces de inmovilizar y retener contaminantes del suelo o agua superficial en la rizósfera, bien sea por absorción, adsorción o precipitación del compuesto por la raíz. De este modo, la movilidad del contaminante se reduce y se previene la

migración del mismo hacia las áreas vecinas, aguas subterráneas o al aire y se reduce así la biodisponibilidad del metal y su entrada a la cadena alimenticia.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESULTADOS

IDENTIFICACION TAXONOMICA DE LAS ESPECIES COLECTADAS EN SITIOS CONTAMINADOS

En los sitios seleccionados y que presentaban signos característicos ostentosos de la presencia de contaminantes químicos en el suelo se observaron algunas especies de plantas arbustivas y arbóreas; sin embargo, sólo se colectaron las especies herbáceas presentes debido a su alta tasa de transpiración, producción de biomasa y facilidad de cosecha, las cuales son características que favorecen su uso como especies fitorremediadoras.

Se analizó el material biológico taxonómicamente mediante claves de identificación. Sin embargo, debido a que en muchos casos no se contó con las

Cuadro 1: Listado del material vegetal recolectado en sitios visiblemente contaminados.

Muestra	Identificación Taxonómica
CDCO-1	Asteraceae
CDCO-2	Malvaceae: <i>Malva parviflora</i>
CDCO-3	Asteraceae
CDCO-4	Convolvulaceae: <i>Ipomea</i> sp
CDCO-5	Asteraceae: <i>Helianthus</i> sp.
CDCO-6	Euphombiaceae: <i>Ricinus communis</i>
CDCO-7	Asteraceae
CDCO-8	Gramineae
CDCO-9	Malvaceae: <i>Malva parviflora</i>
CDCO-10	Asteraceae
FT-1	Asteraceae: <i>Helianthus</i> sp.
FT-2	Asteraceae
FT-3	Asteraceae
PESQ-1	Arbustiva
PESQ-2	Malvaceae: <i>Malva parviflora</i>

partes florales, su caracterización se llevó a cabo hasta el nivel de familia. Las especies recolectadas se encuentran enlistadas en el Cuadro 1.

ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE METALES PESADOS EN LAS ESPECIES COLECTADAS EN SITIOS CONTAMINADOS

Se observó la presencia de ciertos elementos de alto peso atómico provenientes del suelo acumulados en los tejidos de algunas de las plantas analizadas, especialmente Pb, Al, Fe, Cu y Sr, los cuales varían en concentración dependiendo de la especie y el lugar (Gráficas 1, 2 y 3).

De particular importancia resultó ser la especie *Malva parviflora* debido a que hubo casos en que acumuló cantidades bastante elevadas de Pb, Al y Fe (CDCO-2). Sin embargo, la misma especie colectada en otros sitios (CDCO-9 y PESQ-2) mostró cantidades menores de dichos minerales.

Aunque no se hicieron análisis directos del contenido elemental del suelo de las áreas donde se tomaron las muestras vegetales, el uso de las plantas como

bioindicadores de presencia de metales pesados muestra la existencia de cantidades elevadas de Plomo y Aluminio en el suelo del área I, además de la presencia inocua de Hierro. En el área II destacó la presencia de Aluminio, Plomo, Hierro, Cobre, Zinc y Estroncio por orden de importancia. En el área III, además de la presencia de Plomo y Aluminio, se observó también Estroncio y Zinc entre otros metales de menor cuantía.

De particular importancia resultó ser la especie *Malva parviflora* debido a que hubo casos (CDCO-2 en Area I) en que acumuló cantidades bastante elevadas

de Plomo, Aluminio y Hierro. Sin embargo, la misma especie colectada en otros sitios (muestras CDCO-9 y PESQ-2 en Areas I y III) mostró cantidades menores.

PRUEBAS DE GERMINACION

EN SOLUCION ACUOSA DE NITRATO DE PLOMO

Las pruebas de germinación de semillas de *Medicago sativa* (Alfalfa), *Avena sativa* (Avena) y *Lolium multiflorum* (zacate "Rye Grass") en cápsulas de Petri conteniendo Pb en solución acuosa dieron negativas, obteniéndose valores de cero para Alfalfa y Rye Grass y de apenas 16% en Avena (Cuadro 2). Estas últimas no generaron plántulas viables ya que solo desarrollaron raíces y no hubo crecimiento de las partes aéreas.

Cuadro 2: Porcentaje de germinación de plantas expuestas a una solución acuosa de Nitrato de Plomo en cápsulas de Petri (5 mg Pb total en la cápsula).

	Control	Pb (5 mg)
<i>Medicago sativa</i>	100	0
<i>Avena Sativa</i>	64	16
<i>Lolium multiflorum</i>	84	0

EN SOLUCION NUTRITIVA CON PLOMO DISUELTO CON EDTA

Los porcentajes de germinación de las plantas de las especies *Phaseolus vulgaris* var. pinto americano, *Phaseolus vulgaris* var. negro, *Medicago sativa* y *Avena sativa* tratadas con Pb disuelto en solución nutritiva con EDTA tuvieron valores más exitosos que en la prueba de germinación sobre Pb disuelto en agua. A continuación se muestran los valores en el Cuadro 3.

Cuadro 3: Porcentajes de germinación de semillas expuestas a Pb solubilizado en medio de Hoagland con EDTA (n=5).

	Control	200	600	1200	2000
<i>Phaseolus vulgaris</i> var. pinto americano	98 ± 5	93 ± 15	85 ± 15	90 ± 9	83 ± 13
<i>Phaseolus vulgaris</i> var. negro	95 ± 6	100 ± 0	95 ± 5	98 ± 8	78 ± 24
<i>Avena sativa</i>	95 ± 5	88 ± 8	91 ± 7	96 ± 5	91 ± 10
<i>Medicago sativa</i>	75 ± 13	75 ± 13	70 ± 5	77 ± 9	69 ± 12

EN SOLUCION NUTRITIVA CON CADMIO

En el Cuadro 4 se reportan los valores de % de germinación obtenidos al someter a las plantas a 3 y 10 ppm Cd

Cuadro 4: Porcentajes de germinación de semillas expuestas a Cd en perlita (n=5).

	Control	3 ppm	10 ppm
<i>Phaseolus vulgaris</i> var. Pinto americano	98 ± 5	85 ± 12	90 ± 5
<i>Phaseolus vulgaris</i> var. negro	95 ± 6	100 ± 0	100 ± 0
<i>Avena sativa</i>	95 ± 5	96 ± 5	99 ± 3
<i>Medicago sativa</i>	75 ± 13	82 ± 9	73 ± 6

EXPOSICION DE PLOMO EN PLANTAS SILVESTRES

Al realizar el análisis de varianza en todas las individuos de *Malva parviflora* tratadas con Plomo (Cuadro 5), se observaron diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre el contenido del metal en las partes aéreas de la planta (tallos, pecíolos y hojas) y la raíz (Cuadro 6), siendo mayor el contenido en la raíz (31722 ppm) que en las partes aéreas (1864 ppm). Al analizar la cantidad de Plomo absorbida en toda la planta en relación al tamaño o edad de la planta (Gráfica 4) se pudieron observar diferencias significativas ($P < 0.05$

entre los individuos jóvenes, los cuales, acumularon mayor cantidad (20906 ppm) que los individuos maduros (12161 ppm). Ahora bien, aunque no hay diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre la cantidad de plomo acumulada en las raíces de las plantas jóvenes y maduras, sí se observó una acumulación mayor del metal en las hojas de las plantas jóvenes en comparación con las hojas de los individuos maduros (Cuadros 7; Gráfica 5).

Cuadro 5: Análisis de varianza multifactorial del contenido de Plomo en plantas de *Malva parviflora* jóvenes y maduras expuestas a 1000 ppm Pb en medio nutritivo de Hoagland (** indica valores de diferencia altamente significativa).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F calculada	Probabilidad
Tratamiento	1.43E8	1	1.43E8	20.77 **	P<0.01
Organo	4.40E9	1	4.40E9	637.79**	P<0.01

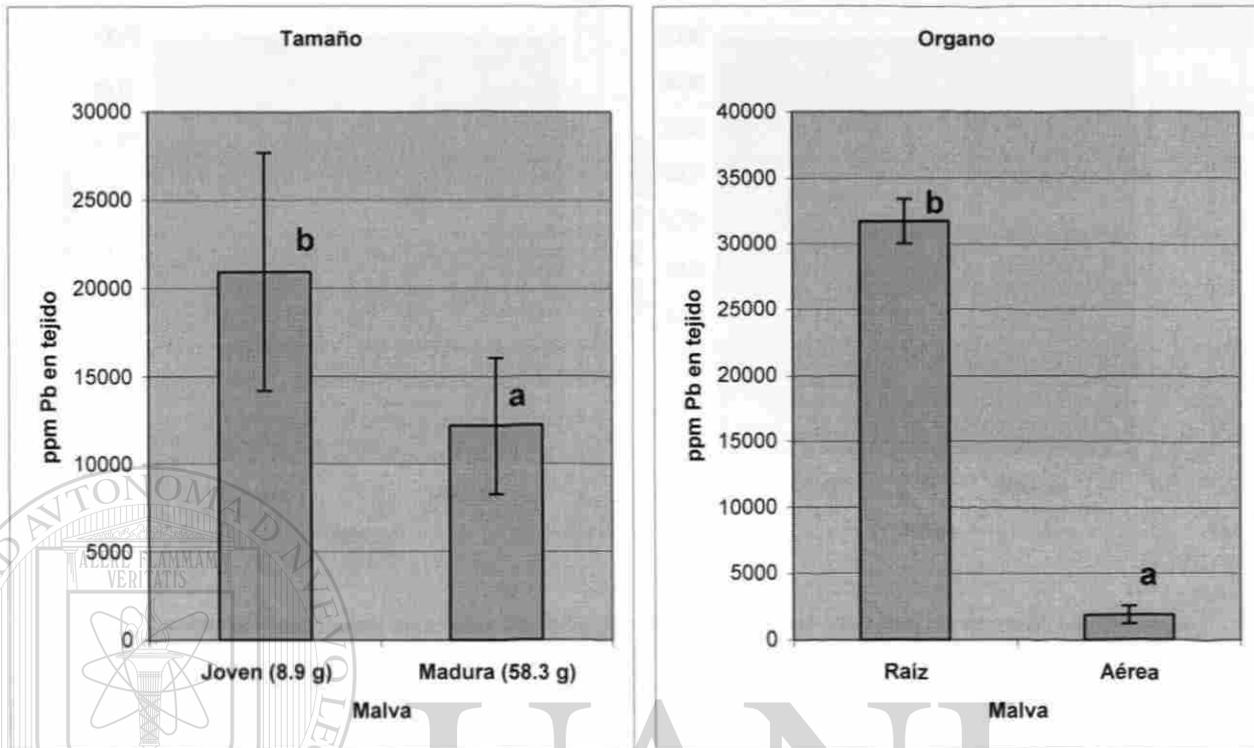
** indica valores de diferencia altamente significativa ($P < 0.01$).

Cuadro 6: Valores promedio del contenido de Plomo en plantas de *Malva parviflora* jóvenes y maduras expuestas a 1000 ppm Pb en medio nutritivo de Hoagland (letras diferentes indican diferencias significativas).

Nivel		Promedio ± Error estándar	Límite de confianza para la media	
Tamaño	Joven (5.8 g)	20906.94 ± 777.81 ^b	18653.48	23160.39
	Adulta (58.3 g)	12161.88 ± 3870.79 ^a	13653.48	16545.29
Organo	Raíz	31722.12 ± 1693.82 ^b	30796.78	34583.34
	Hoja	1864 ± 679.61 ^a	1587.82	5044.46

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.01$).

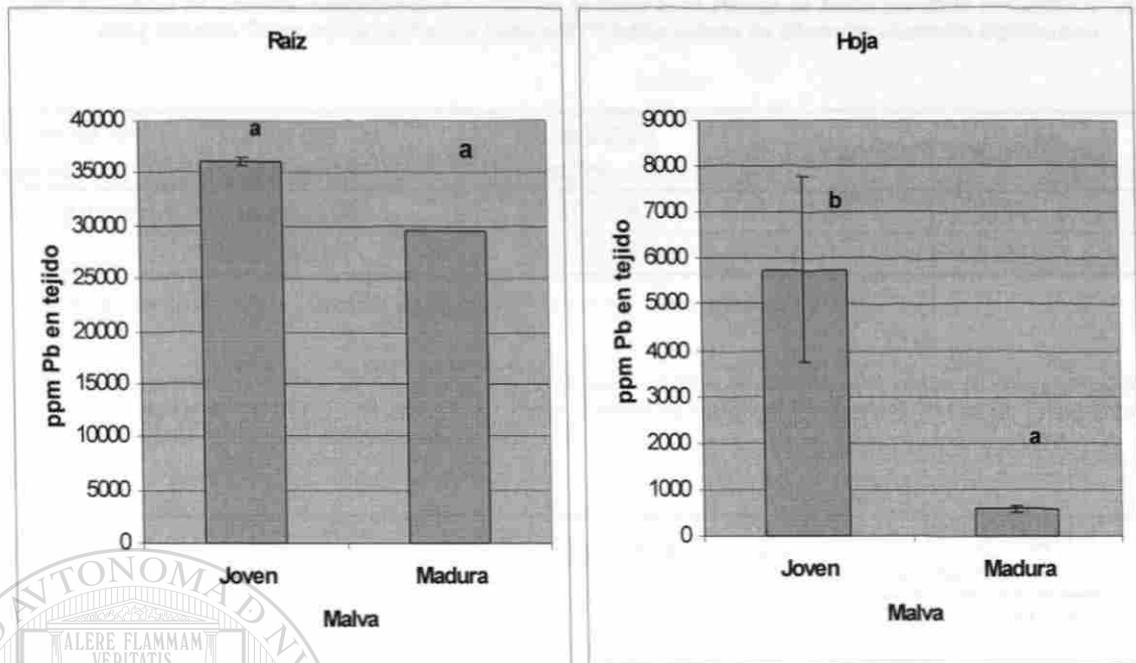
Gráfica 4: Contenido de Plomo tisular en plantas de *Malva parviflora* tratadas con 1000 ppm Pb en medio nutritivo de Hoagland. Izquierda: en plantas jóvenes y maduras. Derecha: En órganos. Letras diferentes indican diferencias significativas.



Cuadro 7: Valores promedio del contenido de Plomo en plantas de *Malva parviflora* según su tamaño, expuestas a 1000 ppm Pb en medio nutritivo de Hoagland (letras diferentes indican diferencias significativas).

Nivel		Promedio ± Error estándar	Límite de confianza para la media	
Raíz	Joven	36057 ± 385 ^b	32027	40087
	Madura	29554 ± 2009 ^a	26704	32404
Hoja	Joven	5756 ± 12 ^b	5698	5814
	Madura	706 ± 28 ^a	665	747

Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.01).



Gráfica 5: Contenido de Plomo tisular en plantas de *Malva parviflora* tratadas con 1000 ppm Pb en medio nutritivo de Hoagland. Izquierda: en plantas jóvenes y maduras. Derecha: En órganos. Letras diferentes indican diferencias significativas.

EXPOSICIÓN DE CADMIO EN PLANTAS SILVESTRES

Las plantas de *Malva parviflora* expuestas a 130 y 260 ppm de Cadmio no presentaron diferencias significativas en el contenido tisular del metal con respecto al control (Cuadros 8 y 9). Sin embargo, al someterse a concentraciones de 390 ppm hubo un incremento considerable y significativo hasta 3991 ppm Cd (Gráfica 4).

Es de hacer notar que la mayor parte del Cadmio absorbido por las plantas se acumuló en las raíces (2337 ppm), siendo muy poco lo que se transportó hacia las partes aéreas.

Cuadro 8: Análisis de varianza multifactorial del contenido de Cadmio en plantas de *Malva parviflora* expuestas a 130, 260 y 390 ppm Cd en medio nutritivo de Hoagland (** indica valores de diferencia altamente significativa).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F calculada	Probabilidad
Tratamiento	59429229	3	19809743	11.79 **	P<0.01
Organo	26528521	1	26528521	15.79 **	P<0.01

** indica valores de diferencia altamente significativa (P<0.01); n.s.= no significativa (P>0.5).

Cuadro 9: Comparación múltiple de los valores promedio del contenido de Cadmio en plantas de *Malva parviflora* expuestas a 130, 260 y 390 ppm Cd en medio nutritivo de Hoagland mediante la prueba de Tukey (letras diferentes indican diferencias significativas).

Nivel		Promedio ± E.E. (ppm)	Límite de confianza para la media	
Tratamiento	Control	0 ± 0 ^a	-1097.67	1097.67
	130 ppm	503.58 ± 146.49 ^a	-594.09	1601.25
	260 ppm	477.76 ± 227.97 ^a	-98.85	1727.78
	390 ppm	3991.21 ± 1403.62 ^b	2893.54	5088.88
Organo	Raíz	2337.42 ± 847.45 ^b	1561.25	3113.60
	Hoja	214.63 ± 87.01 ^a	396.77	1031.17

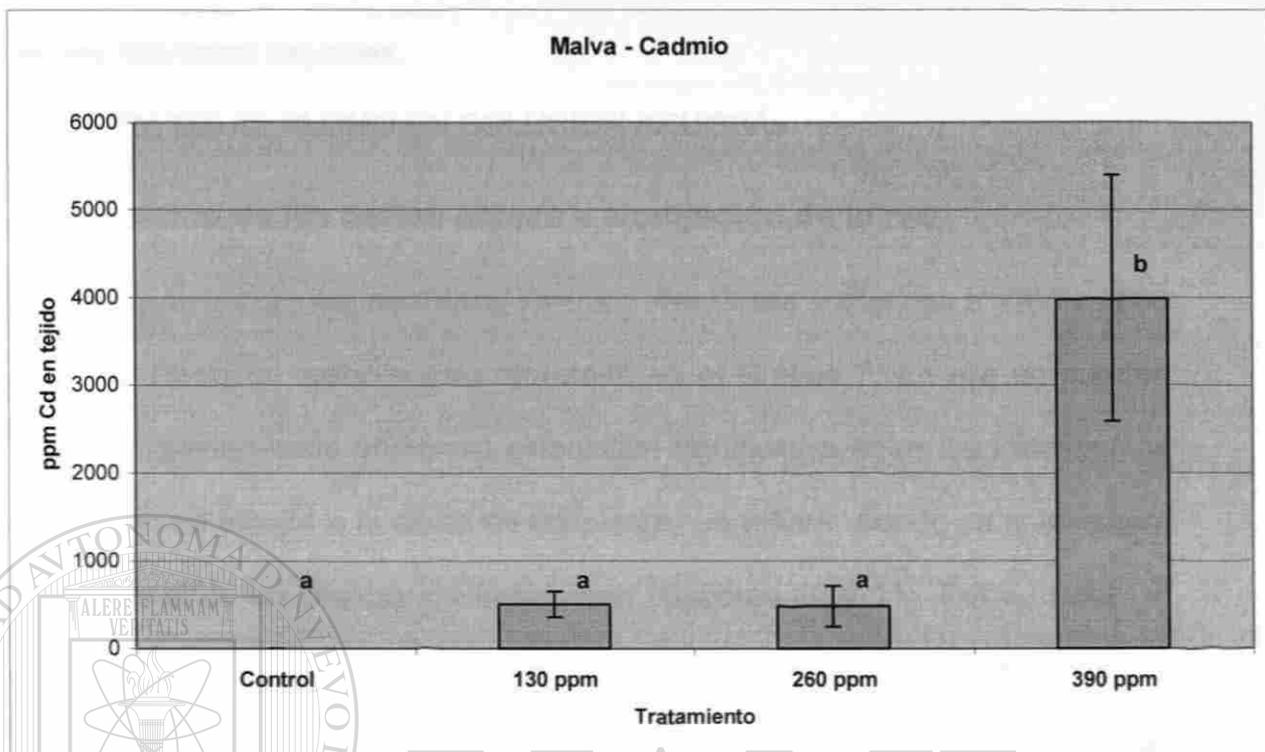
Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.01).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

... en forma importante con respecto al control



Gráfica 6: Contenido de Cadmio en *Malva parviflora* expuesta a 130, 260 y 390 ppm Cd en medio nutritivo de Hoagland. Letras diferentes indican diferencias significativas.

EXPOSICION DE PLOMO EN PLANTAS DE CULTIVO

PRUEBAS DE TOLERANCIA *IN VITRO*

Las plántulas de alfalfa y "Rye Grass" de 9 días de haber sido sembradas en cápsulas de Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada y sometidas posteriormente a 5 mg de Plomo no mostraron señales cualitativas que mostraran algún efecto nocivo letal del metal en ellas, excepto por una disminución en el tono de su coloración verde en las hojas. Por su parte, en la avena esta disminución en la intensidad de color fue mucho más notoria y se observaron áreas con fuerte clorosis en las porciones distales de las hojas. El

crecimiento no se observó alterado en forma importante con respecto al control en las diferentes especies.

EXPOSICION AL PLOMO EN SOLUCION ACUOSA

Crecimiento de las partes aéreas y elongación de la raíz

La altura de las plantas de Alfalfa, Avena y Rye Grass sometidas a 1000 y 5000 ppm de Pb en el sustrato está reportada en el Gráfico 7. En ella se pueden apreciar que no hubo diferencia estadística significativa entre los tratamientos ($P=0.07$) en cuanto a la altura de las plantas se refiere, siendo su crecimiento parecido al de las plantas sin tratamiento (Cuadros 10 y 11). Por su parte, el análisis de varianza muestra diferencias en la altura de las plantas entre las especies, lo cual es debido simplemente a las características genéticas propias que determinan la altura de cada especie.

Cuadro 10: Análisis de varianza del largo de las partes aéreas y raíces en plantas de *Medicago sativa*, *Avena sativa* y *Lolium multiflorum* expuestas a 1000 y 5000 ppm Pb en solución acuosa (** indica valores de diferencia altamente significativa).

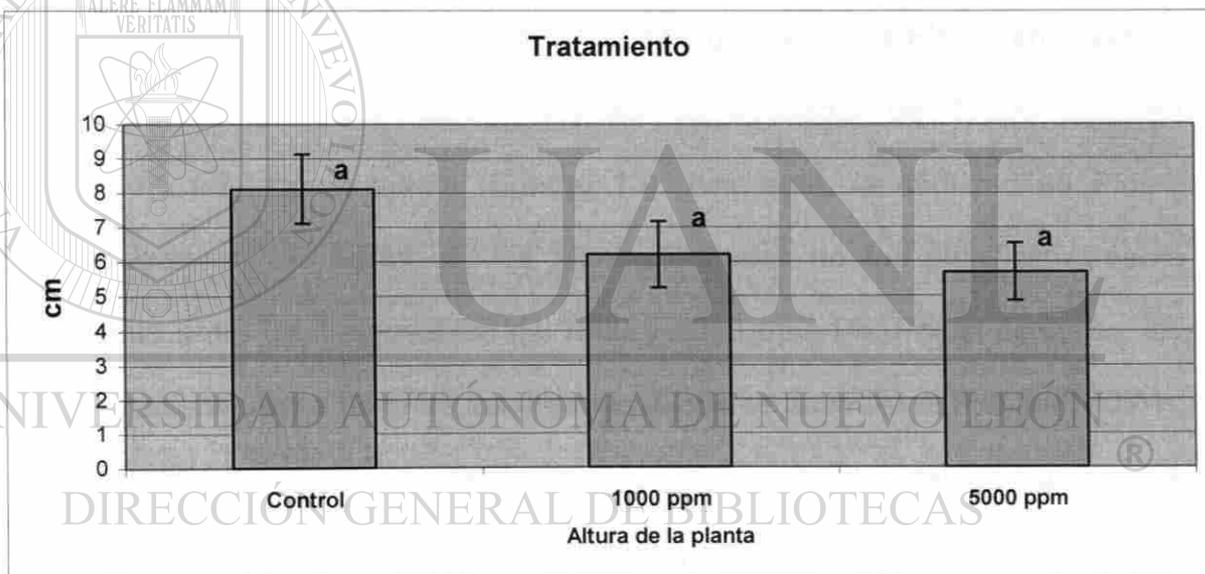
Variable	Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F calculada	Probabilidad
Largo	Especie	461.86	2	230.93	21.56 **	$P<0.01$
	Tratamiento	55.94	2	27.97	2.61 n.s.	$P=0.07$
	Organo	1685.55	1	1685.55	157.41 **	$P<0.01$

** indica valores de diferencia altamente significativa ($P<0.01$); n.s. = no significativa ($P>0.5$).

Cuadro 11: Comparación múltiple de los valores promedio del largo de las partes aéreas y raíces en plantas de *Medicago sativa*, *Avena sativa* y *Lolium multiflorum* expuestas a 1000 y 5000 ppm Pb en medio acuoso mediante la prueba de Tukey (letras diferentes indican diferencias significativas).

Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.01).

Nivel		Promedio ± Error estándar	Límite de confianza para la media	
Especie	Alfalfa	1 8.99 ± 1.29 ^b	7.80	10.17
	Avena	2 8.35 ± 1.14 ^b	7.16	9.54
	Rye Grass	3 3.89 ± 0.23 ^a	2.70	5.08
Tratamiento	Control	1 8.12 ± 1.00 ^a	6.93	9.31
	1000 ppm	2 6.21 ± 0.97 ^a	5.71	8.08
	5000 ppm	3 5.70 ± 0.83 ^a	5.03	7.40
Organo	Tallo	1 11.40 ± 0.83 ^b	10.43	12.37
	Raíz	2 2.75 ± 0.15 ^a	1.78	3.72



Gráfica 7: Comparación múltiple de los valores promedio del largo (cm) de las partes aéreas y raíces en plantas de *Medicago sativa*, *Avena sativa* y *Lolium multiflorum* expuestas a 1000 y 5000 ppm Pb en solución acuosa. Letras diferentes indican diferencias significativas (P>0.05).

Análisis del contenido de Plomo

Los análisis por espectrofotometría de emisión por plasma inductivamente acoplado muestran que hubo grandes acumulaciones de Plomo tanto en las

raíces como en las partes aéreas de las plantas tratadas. En Rye Grass la acumulación llegó a niveles superiores al 1% mientras que en Alfalfa y Avena se observaron cantidades de 6422 y 2314 ppm Pb en Alfalfa y Avena respectivamente.

En la Gráfica 8 es posible observar que las plantas tratadas con Pb contienen en el tejido concentraciones de Pb significativamente diferentes a los controles ($P < 0,01$), los cuales, obviamente no contienen Pb. Sin embargo, se observó que la acumulación de Plomo en los individuos de Alfalfa y Avena tratados no fue diferente entre ellas aunque sí es alta entre estas dos especies y Rye Grass tratado (Gráfica 8). Esta última es la especie que acumula Plomo en mayores cantidades, llegando a concentraciones de alrededor de 11500 ppm en promedio en toda la planta (Cuadro 13). Asimismo, la cantidad de Plomo acumulado en los tejidos de las plantas tratadas no fue significativamente diferente entre los tratamientos de 1000 y 5000 ppm Pb. Por el contrario, las diferencias fueron altas entre los órganos donde se acumula el Plomo ($P < 0.01$), siendo en la raíz donde permanece la mayor cantidad del metal. La especie que reporta mayor concentración de Pb en hoja y raíz de *Lolium multiflorum*.

Cuadro 12: Análisis de varianza del contenido de Plomo (ppm) en plantas de *Medicago sativa*, *Avena sativa* y *Lolium multiflorum* expuestas a 1000 y 5000 ppm Pb en solución acuosa (** indica valores de diferencia altamente

Elemento	Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F calculada	Probabilidad
Pb	Especie	5.314E8	2	2.66E8	9.476 **	P<0.01
	Tratamiento	1.42E9	2	7.11E8	25.363 **	P<0.01
	Componente	9.06E8	1	9.06E8	32.323 **	P<0.01

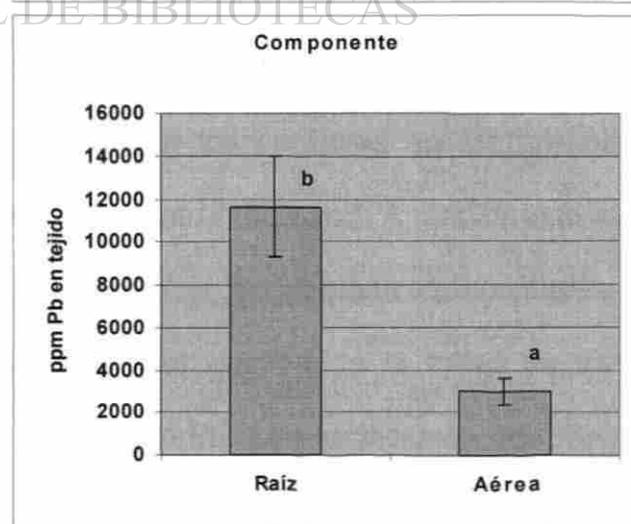
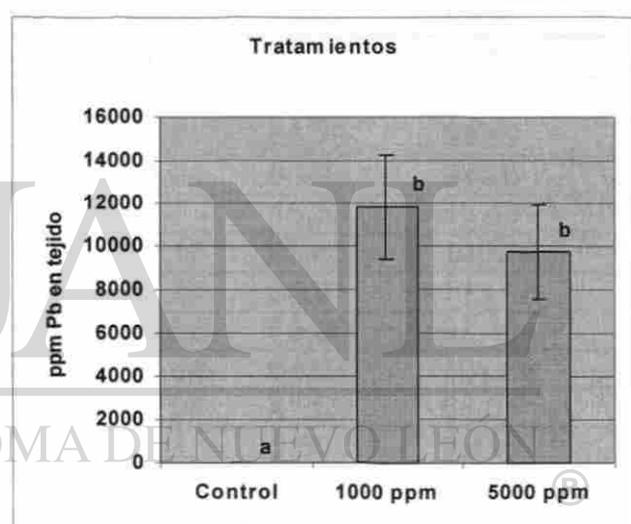
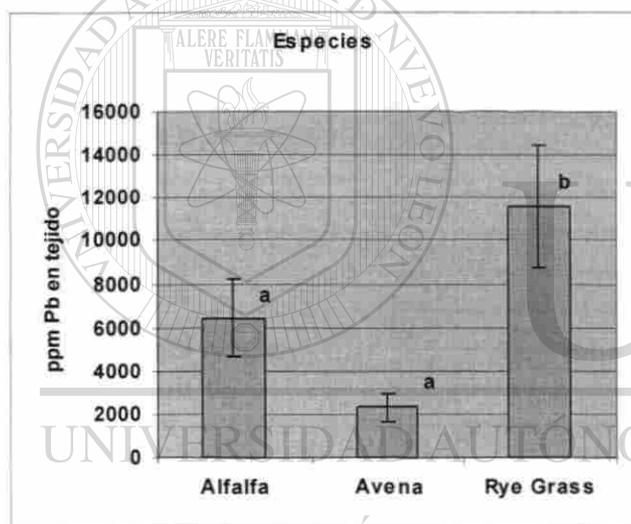
significativa).

** indica valores de diferencia altamente significativa ($P < 0.01$); n.s.= no significativa ($P > 0.5$).

Cuadro 13: Comparación múltiple del contenido de Plomo (ppm) en plantas de *Medicago sativa*, *Avena sativa* y *Lolium multiflorum* expuestas a 1000 y 5000 ppm Pb en medio acuoso mediante prueba de Tukey (letras diferentes indican diferencias significativas).

Nivel		Promedio ± Error estándar	Límite de confianza para el valor promedio	
Especie	Alfalfa	6422.31 ^a ± 1785.78	3907.86	8936.76
	Avena	2314.44 ^a ± 649.04	882.72	6505.19
	Rye Grass	11595.49 ^b ± 2833.81	9081.04	14109.93
Tratamiento	Control	0.00 ^a ± 0	-2514.45	2514.45
	1000 ppm	11841.1 ^b ± 2450.45	9326.67	14335.56
	5000 ppm	9726.4 ^b ± 2164.96	7059.40	12681.87
Componente	Raíz	11615.18 ^b ± 2337.12	9283.91	13718.98
		2973.0 ^a ± 623.54	920.02	5026.09

Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.01).



Gráfica 8: Comparación múltiple de los valores promedio del largo de las partes aéreas y raíces en plantas de *Medicago sativa*, *Avena sativa* y *Lolium multiflorum* expuestas a 1000 y 5000 ppm Pb en solución acuosa. Izquierda: Concentración en toda la planta. Derecha: Contenido de Plomo tisular en todas las especies según el tratamiento. Abajo: Acumulación en raíz y partes aéreas. Letras diferentes indican diferencias significativas.

EXPOSICION AL PLOMO EN MEDIO DE HOAGLAND CON EDTA

Variaciones en la formación de biomasa

Los resultados sobre la variación del peso seco de muestras tipo compuesta de 30 individuos cada una se exponen en el Cuadro 14 y la Gráfica 9 (superior y medio) para las dos variedades de *Phaseolus vulgaris* y en el Cuadro 15 y Gráfica 9 (abajo) para *Avena sativa*

Cuadro 14: Peso seco (mg/planta) de plantas de 4 semanas de *Phaseolus vulgaris* var. pinto americano y *P. vulgaris* var. negro expuestas a Plomo solubilizado con EDTA en medio nutritivo de Hoagland.

Especie	Conc	Hoja	Raíz	Tallo	Toda
Pinto americano	Control	16.03	17.77	65.82	93.18
	200	22.99	37.25	113.51	173.75
	600	12.09	17.61	66.76	93.99
	1200	9.30	20.04	69.85	96.26
	2000	6.17	8.57	15.83	40.43
	Frijol Negro	Control	24.51	20.15	63.45
	200	21.98	22.27	68.91	113.16
	600	5.15	18.95	73.00	97.10
	1200	18.97	18.84	64.07	101.88
	2000	0.00	20.95	47.59	68.54
	2000	4.50	1.91	0.00	6.41

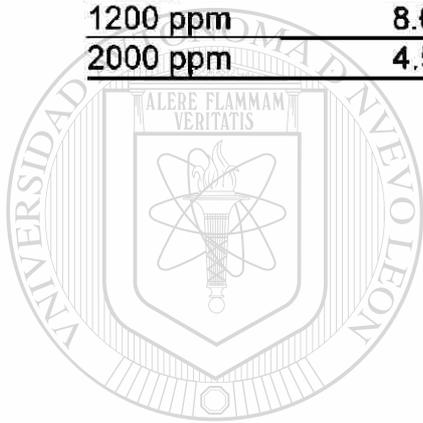
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En ellas se puede apreciar que generalmente hay una tendencia al aumento de la producción de biomasa total por encima de los controles en los niveles menores de concentración de Plomo en el sustrato (200 ppm). A medida que la concentración en el sustrato aumenta, la producción de biomasa total comienza a disminuir hasta llegar a valores un poco por encima de la mitad de los controles en las plantas expuestas a 2000 ppm Pb. Las variaciones del peso

seco total son producidas principalmente por variaciones en el peso seco de los tallos en el frijol.

Cuadro 15: Peso seco (mg/planta) de plantas de 4 semanas de *Avena sativa* expuestas a distintas concentraciones de Plomo en medio nutritivo de Hoagland con EDTA (n= 30).

Tratamiento	Hoja	Raíz	Toda
Control	7.62	4.97	12.59
200 ppm	7.37	4.43	11.79
600 ppm	8.54	5.49	14.04
1200 ppm	8.66	4.66	13.33
2000 ppm	4.50	1.91	6.41

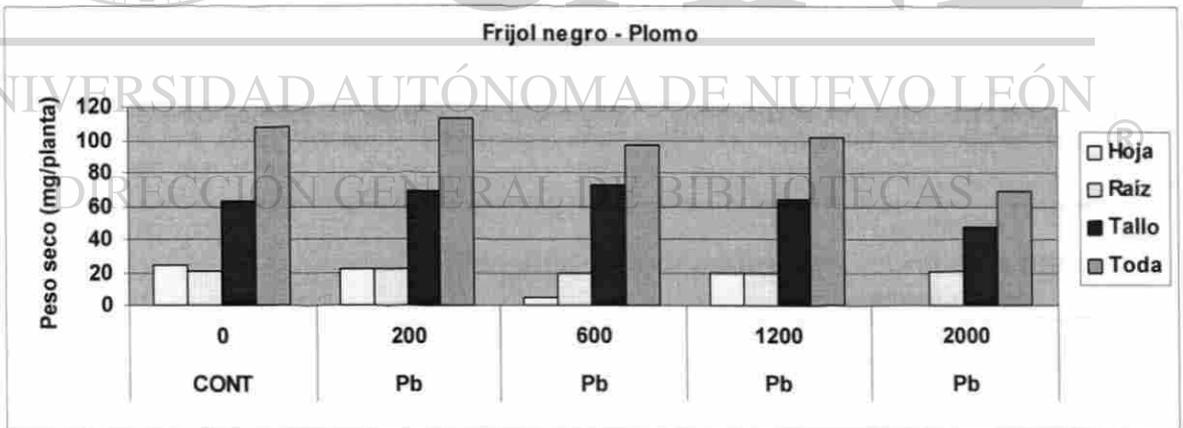
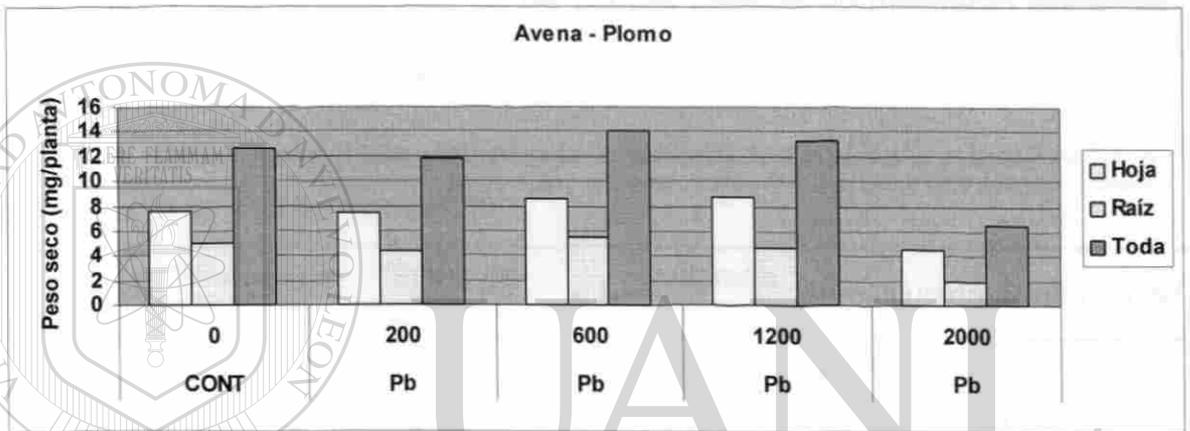
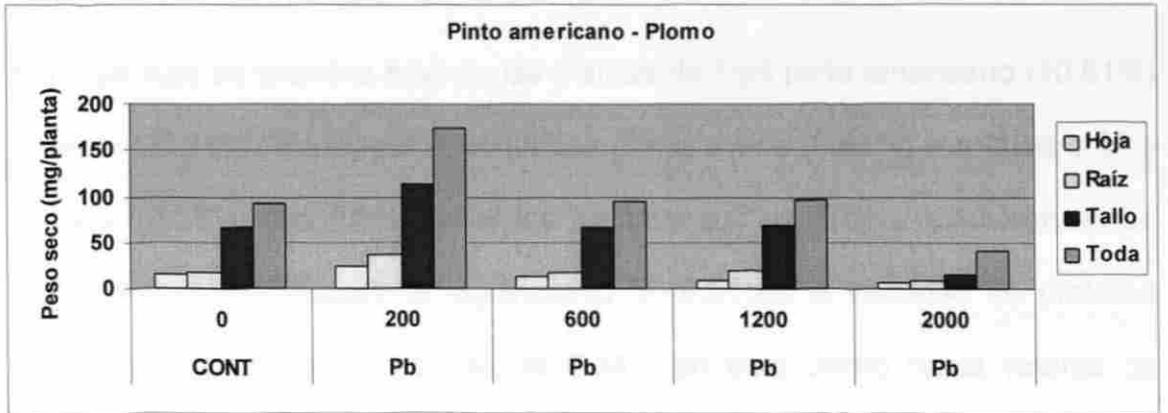


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Gráfica 9: Peso seco (mg/planta) en diferentes órganos de plantas expuestas a diferentes concentraciones de Plomo en medio nutritivo de Hoagland con EDTA. Arriba: Frijol pinto americano. Medio: Frijol negro. Abajo: Avena. Muestra de tipo compuesta de n= 30 individuos.

Variación en la cantidad de Proteína Total

El porcentaje de proteína total de las plantas de frijol pinto americano (10.81%) y negro (10.78%) fue mayor al contenido por la avena (6.93%; ver Cuadro 17 y Gráfica 10). Por otra parte, todos los tratamientos de Plomo resultaron en un incremento estadísticamente significativo ($P < 0.01$) en la cantidad de proteína total con respecto al control, desde 6.94% en este último hasta valores de 10.8%. Los valores obtenidos en las plantas tratadas no mostraron diferencia estadística significativa entre ellos ($P > 0.05$).

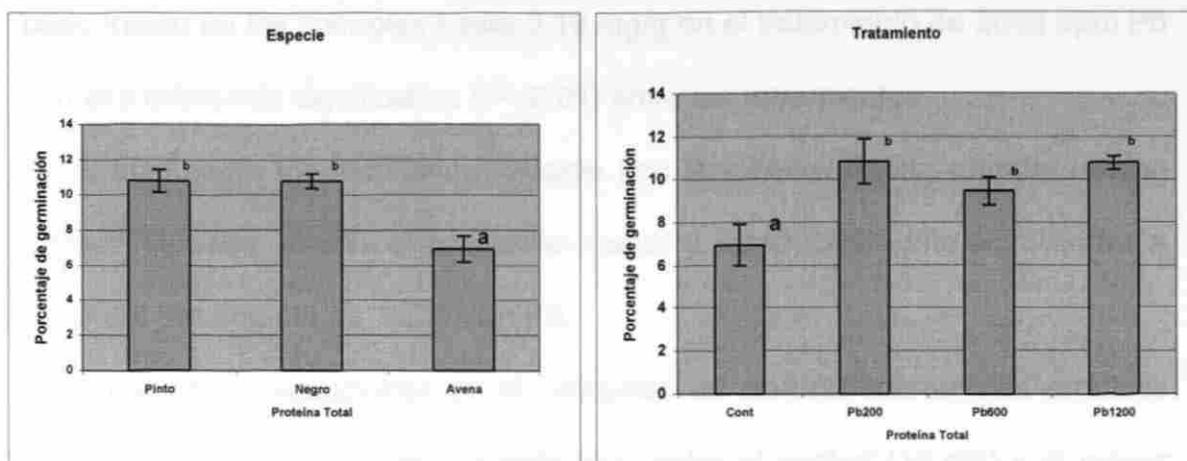
Cuadro 16: Análisis de varianza multifactorial del contenido de Proteína Total en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. pinto americano, *P. vulgaris* var. negro y *Avena sativa* expuestas a 200, 300, 600 y 1200 ppm Pb solubilizado en medio nutritivo de Hoagland con EDTA.

Elemento	Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F calculada	Probabilidad
ProtTot	Especie	119.50	2	59.75	28.43 **	P<0.01
	Tratamiento	90.14	3	30.04	14.29 **	P<0.01

** indica valores de diferencia altamente significativa ($P < 0.01$); n.s. = no significativa ($P > 0.5$).

Cuadro 17: Comparación múltiple de los valores promedio del contenido de Proteína total de las partes aéreas y raíces en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. pinto americano, *P. vulgaris* var. negro y *Avena sativa* expuestas a 200, 300, 600, 1200 y 2000 ppm Pb solubilizado en medio nutritivo de Hoagland con EDTA mediante la prueba de Tukey.

Nivel		Promedio ± Error estándar	Límite de confianza para la media	
Especie	F.pinto amer.	10.81 ± 0.66 ^b	9.95	11.65
	Negro	10.78 ± 0.42 ^b	9.93	11.63
	Avena	6.93 ± 0.74 ^a	6.07	7.78
Tratamiento	Control	6.94 ± 0.94 ^a	5.95	7.93
	200 ppm	10.83 ± 1.06 ^b	9.84	11.82
	600 ppm	9.45 ± 0.66 ^b	8.45	10.43
	1200 ppm	10.80 ± 0.33 ^b	9.81	11.78



Gráfica 10: Comparación múltiple de los valores promedio del contenido de proteína total en *Phaseolus vulgaris* var. pinto americano, *P. vulgaris* var. negro y *Avena sativa* expuestas a diferentes concentraciones de Plomo solubilizado en medio nutritivo de Hoagland con EDTA mediante la prueba de Tukey (letras diferentes indican diferencias significativas).

Variación en el contenido de clorofila

El análisis estadístico muestra que el frijol pinto americano y la avena poseen una cantidad similar de clorofila α , β y total. Por su parte, el frijol negro tiene una cantidad significativamente mayor del pigmento, mientras que la alfalfa es

la especie que mayor concentración de clorofila contiene (Gráfica 11). El análisis de los datos también señala que la concentración de clorofila en el tratamiento con menor cantidad de Pb no es diferente al control y hasta aumenta su valor muy ligeramente. Sin embargo, la concentración de clorofila posteriormente cae en proporción con la concentración de Plomo en el sustrato. En la Gráfica 11 se puede apreciar el contenido de clorofila total para cada especie expuesta a Plomo. En el frijol pinto americano ésta disminuyó proporcionalmente con la dosis de tratamiento suministrada desde 22.2 mg/g

peso fresco en los controles hasta 9.19 mg/g en el tratamiento de 2000 ppm Pb con alta diferencia significativa ($P < 0.01$) entre los tratamientos.

En el frijol negro los resultados tuvieron una tendencia similar, aunque mucho menos marcada, siendo el contenido menor y estadísticamente significativo a partir del tratamiento de 1200 ppm Pb.

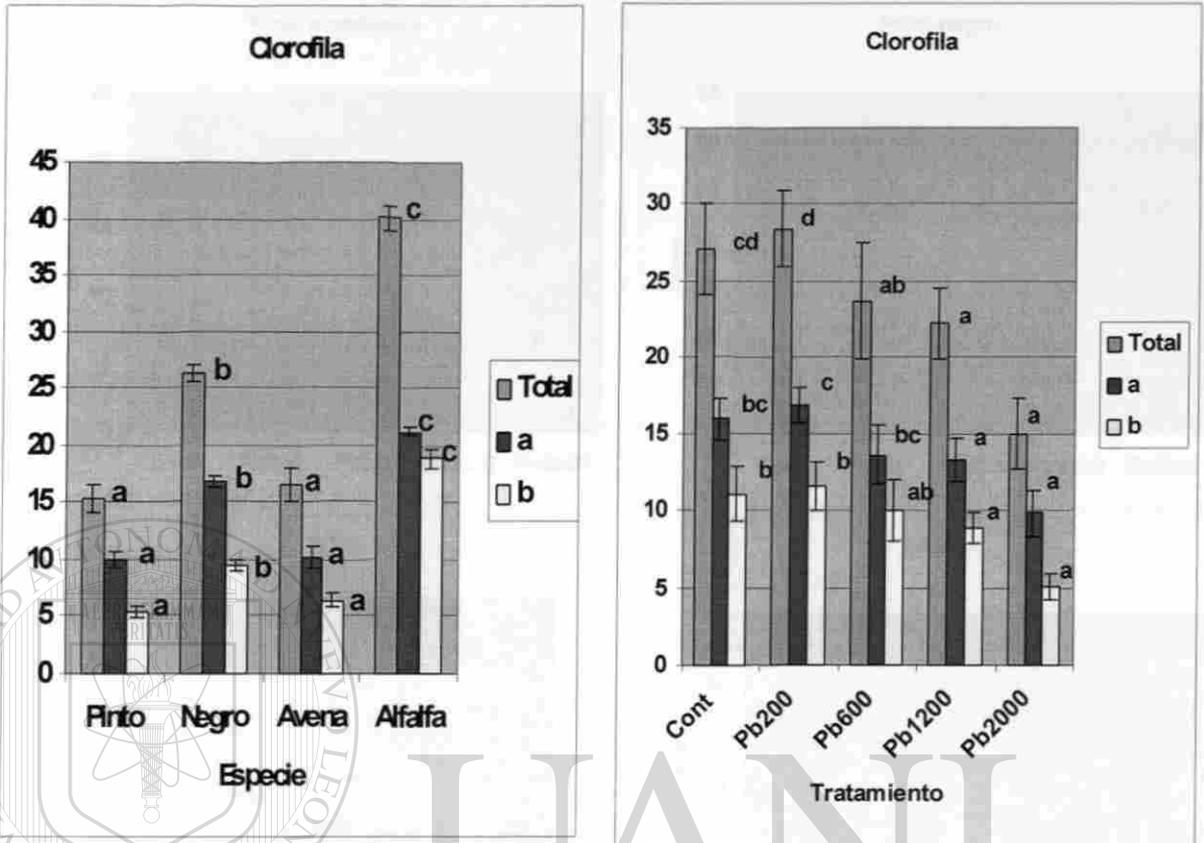
En la avena las variaciones en el contenido de clorofila fueron más erráticas notándose una alta diferencia significativa entre el control (15.4%) y el mayor valor en el tratamiento de 200 ppm Pb (26 mg/g), el cual baja en los tratamientos posteriores a niveles mínimos de 11.5 mg/g.

La alfalfa no muestra diferencia estadística significativa entre el contenido de clorofila en los controles y los tratamientos de 200 y 600 ppm Pb. Es sólo a partir del tratamiento de 1200 ppm Pb que el contenido de clorofila baja a niveles estadísticamente diferentes desde 42 mg/g en el control hasta 31 mg/g.

Cuadro 18: Análisis de varianza entre especies, tratamientos y órganos del contenido de Clorofila (mg/g peso fresco) en las plantas expuestas a 200, 600, 1200 y 2000 ppm Pb solubilizado en solución nutritiva de Hoagland pH 5.5.

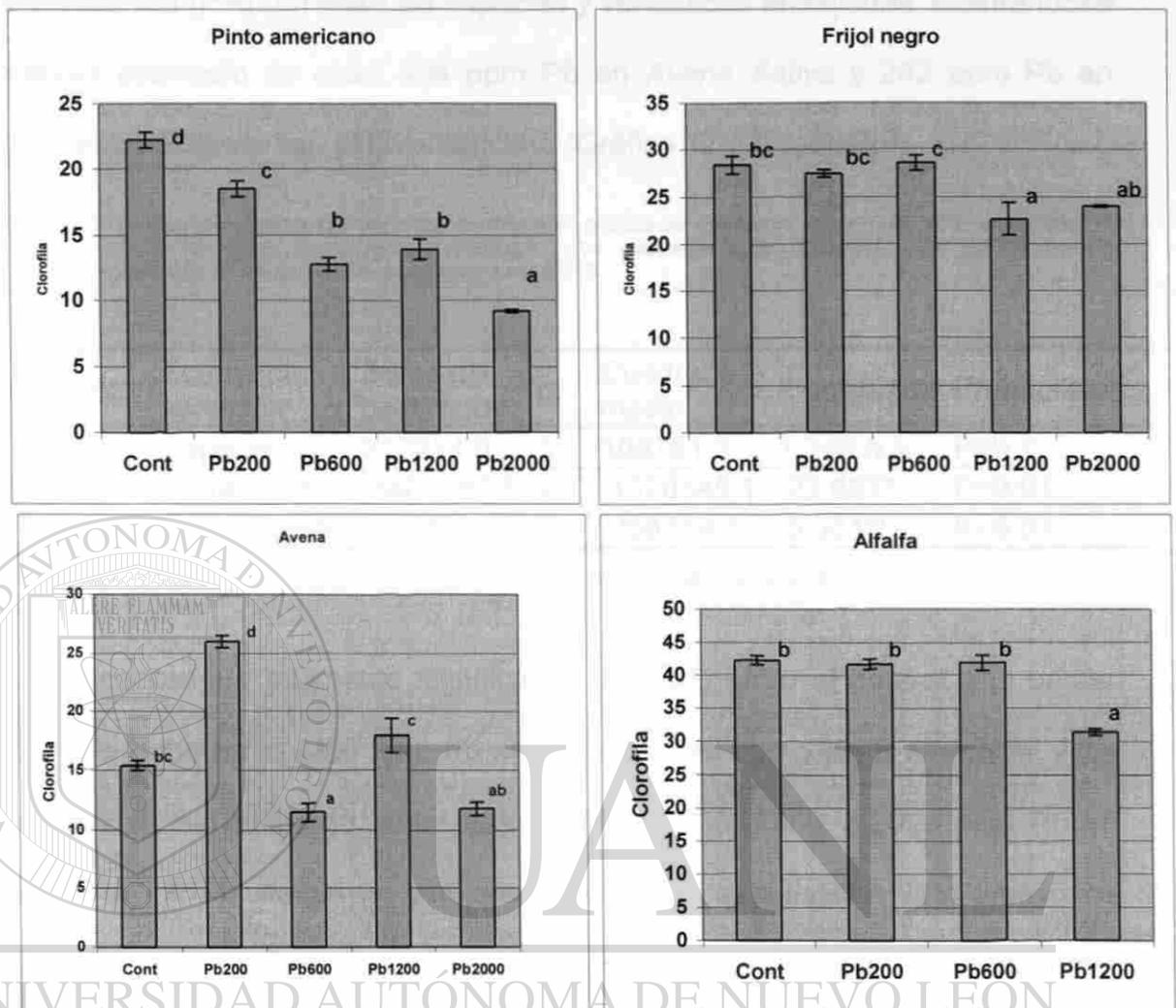
Variable	Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F calculada	Probabilidad
Clorofila Total	Especie	4528.24	3	1509.41	144.13 **	P<0.01
	Tratamiento	513.15	4	128.34	12.25**	P<0.01
Clorofila α	Especie	1069.80	3	356.60	79.06**	P<0.01
	Tratamiento	170.28	4	42.51	9.44**	P<0.01
Clorofila α	Especie	1282.35	3	427.41	133.65 **	P<0.01
	Tratamiento	156.71	4	24.03	7.51**	P<0.01

** indica valores de diferencia altamente significativa ($P < 0.01$); n.s.= no significativa ($P > 0.5$).



Gráfica 11: Variación en el contenido de Clorofila (mg/g peso fresco) en las plantas expuestas a 200, 600, 1200 y 2000 ppm Pb solubilizado en solución nutritiva de Hoagland pH 5.5. Letras diferentes indican diferencias significativas mediante la prueba de Tukey. Izquierda: en cada especie. Derecha: en cada tratamiento.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Gráfica 12: Variación en el contenido de clorofila en cada especie expuesta a 200, 600, 1200 y 2000 ppm Pb solubilizado en solución nutritiva de Hoagland pH 5.5. Letras diferentes indican diferencias significativas mediante la prueba de Tukey.

Análisis del Plomo tisular

El análisis estadístico efectuado sobre las plantas sometidas a Pb solubilizado en solución nutritiva de Hoagland muestra diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre las plantas tratadas que acumularon Plomo y los controles (Cuadro 19). Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente

significativas ($P > 0.05$) entre las especies y variedades ensayadas, mostrándose valores promedio de entre 404 ppm Pb en *Avena Sativa* y 243 ppm Pb en *Phaseolus vulgaris* var. pinto americano (Gráfica 12 y Cuadro 20).

Cuadro 19: Análisis de varianza del contenido de Plomo en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. pinto americano, *P. vulgaris* var. negro, *Avena sativa* y *Medicago sativa* expuestas a 200, 300, 600, 1200 y 2000 ppm Pb solubilizado en medio nutritivo de Hoagland con EDTA

Elemento	Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F calculada	Probabilidad
Pb	Especie	317254.0	3	105751.3	1.748 n.s.	$P > 0.1$
	Tratamiento	5481380.5	4	1370345.1	22.657**	$P < 0.01$
	Componente	717439.4	2	358719.7	5.931**	$P < 0.01$

** indica valores de diferencia altamente significativa ($P < 0.01$); n.s.= no significativa ($P > 0.5$).

La diferencia fue altamente significativa ($P < 0.01$) entre el control y el primer nivel de tratamiento (200 ppm Pb en sustrato), así como entre este nivel y los siguientes. Sin embargo, entre estos últimos (600, 1200 y 2000 ppm Pb en sustrato) los resultados no arrojaron diferencias estadísticas. Los promedios fueron de 204 ppm Pb tisular para el tratamiento con 200 ppm Pb en sustrato, mientras que en los demás tratamientos los valores se situaron entre 419 y 537 ppm Pb tisular (Cuadro 20).

En cuanto a los sitios de acumulación en las plantas, se observó que donde se genera mayor concentración de Plomo tisular es en las hojas (407 ppm Pb), siendo sus valores significativamente diferentes a los mostrados en los tallos (218 ppm Pb) y raíces (270 ppm Pb). Entre estos últimos no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$).

Cuadro 20: Comparación múltiple de los valores promedio del contenido de Plomo de las partes aéreas y raíces en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. pinto americano, *P. vulgaris* var. negro, *Avena sativa* y *Medicago sativa*

expuestas a 200, 300, 600, 1200 y 2000 ppm Pb solubilizado en medio nutritivo de Hoagland con EDTA mediante la prueba de Tukey.

Nivel	Promedio \pm Error estándar	Límite de confianza para el valor promedio	
Especie	1 243.04 \pm 34.38 ^a	170.52	315.57
	2 320.44 \pm 41.4 ^a	247.92	392.97
	3 404.99 \pm 82.49 ^a	277.20	469.08
	4 316.95 \pm 69.27 ^a	233.23	449.29
Tratamiento	1 0.00 \pm 0.00 ^a	-96.24	85.86
	2 203.98 \pm 35.6 ^b	107.73	289.83
	3 418.81 \pm 48.14 ^c	322.56	504.67
	4 451.19 \pm 54.59 ^c	354.94	537.05
	5 537.25 \pm 81.40 ^c	439.27	649.06
Componente	1 218.03 \pm 40.75 ^a	155.67	355.84
	2 269.86 \pm 39.49 ^a	218.00	347.66
	3 406.84 \pm 48.40 ^b	354.98	484.65

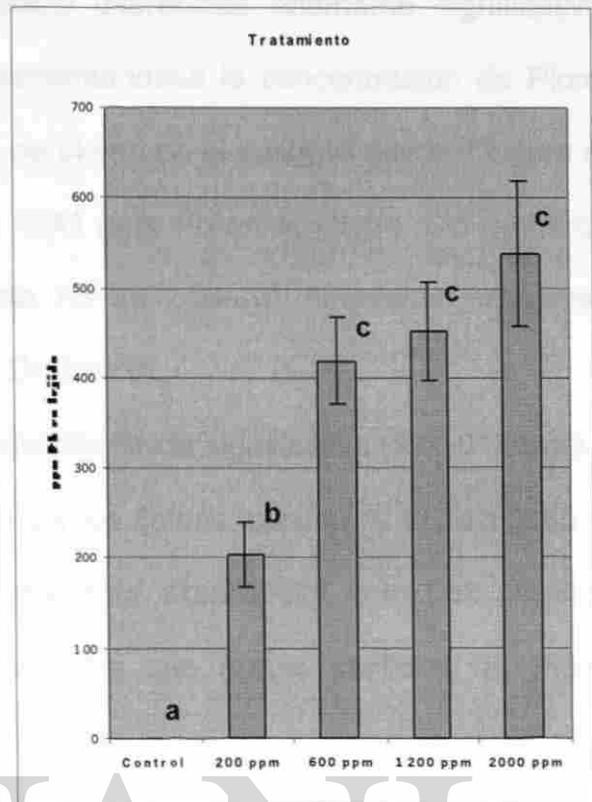
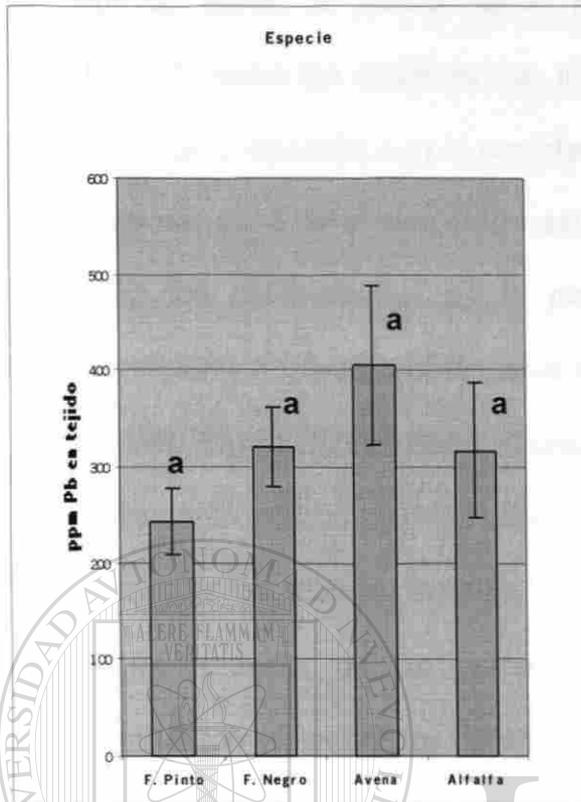
Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.01$).

En el análisis de varianza entre tratamientos y componentes u órganos para cada especie en particular se muestra que en ninguna de las dos variedades de *Phaseolus vulgaris* se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los órganos ni entre los tratamientos (Gráfica 13).

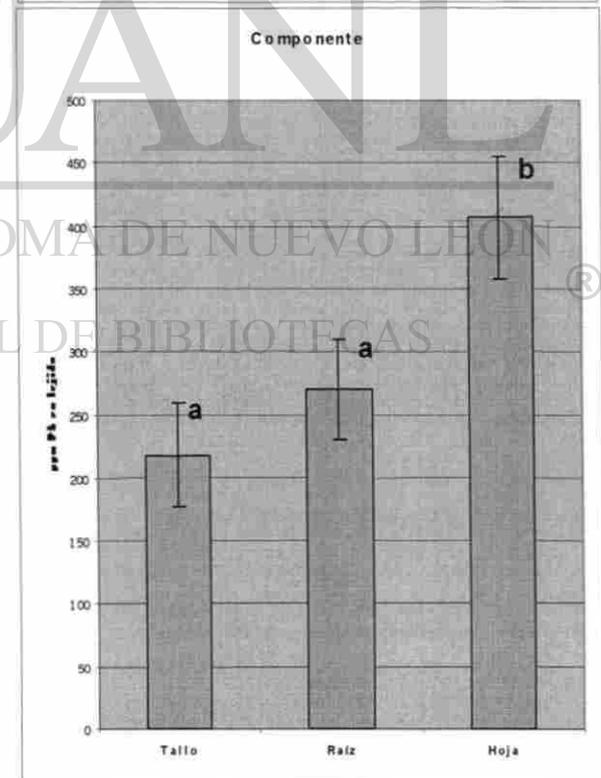
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

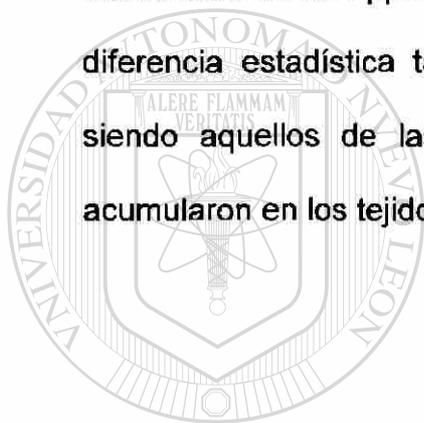


Gráfica 13: : Contenido de Plomo tisular en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. pinto americano, *P. vulgaris* var. negro, *Avena sativa* y *Medicago sativa* expuestas a diferentes concentraciones de Plomo solubilizado en medio nutritivo de Hoagland con EDTA. Izquierda: Concentración en toda la planta. Derecha: Variación del contenido en todas las especies según el tratamiento. Abajo: Acumulación en órganos. Letras diferentes indican diferencias significativas.



Por su parte, la *Avena sativa* mostró diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre los tratamientos, incrementándose la concentración de Plomo tisular en proporción con la cantidad de plomo en el sustrato desde 72 ppm en el primer nivel de tratamiento hasta 1041 ppm Pb en el último. Sin embargo, entre los componentes de la planta no se observó diferencia estadística significativa ($P > 0.05$), como indica la Gráfica 14.

En *Medicago sativa* se observó una alta diferencia significativa ($P < 0.01$) entre el tratamiento de 200 ppm Pb en sustrato y los demás tratamientos. Asimismo, la diferencia estadística también fue altamente significativa entre los órganos, siendo aquellos de las partes aéreas los que mayor cantidad de Plomo acumularon en los tejidos (Gráfica 14).

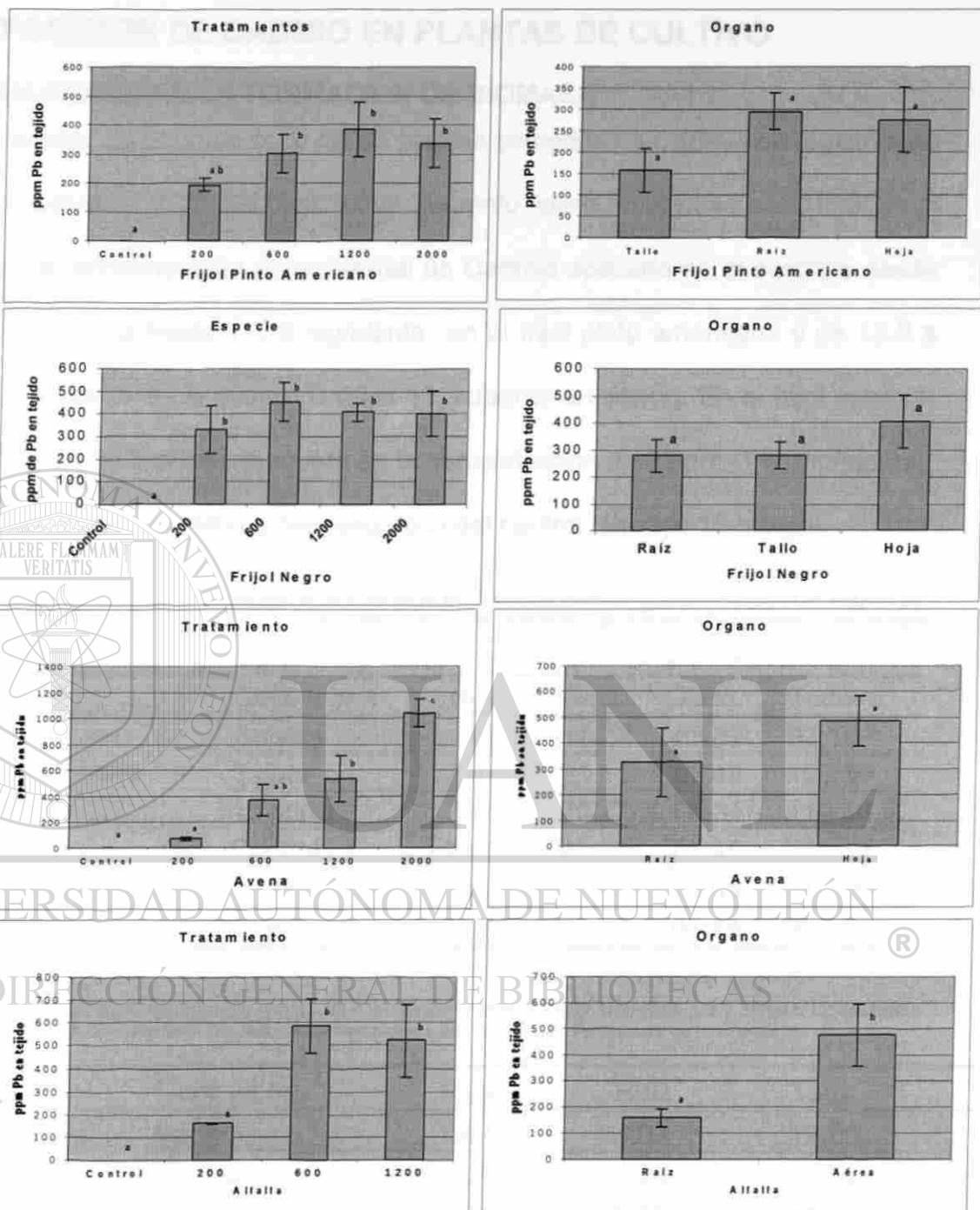


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Gráfica 14; De arriba abajo: Contenido de Plomo en *Phaseolus vulgaris* var. pinto americano, *P. vulgaris* var. negro, *Avena sativa* y *Medicago sativa* expuestas a diferentes concentraciones de Plomo disuelto en medio de Hoagland con EDTA. Izquierda: Contenido de Plomo en la planta según el tratamiento. Derecha: Acumulación en raíz y partes aéreas. Letras diferentes indican diferencias significativas.

EXPOSICION DE CADMIO EN PLANTAS DE CULTIVO

VARIACIONES EN LA FORMACION DE BIOMASA

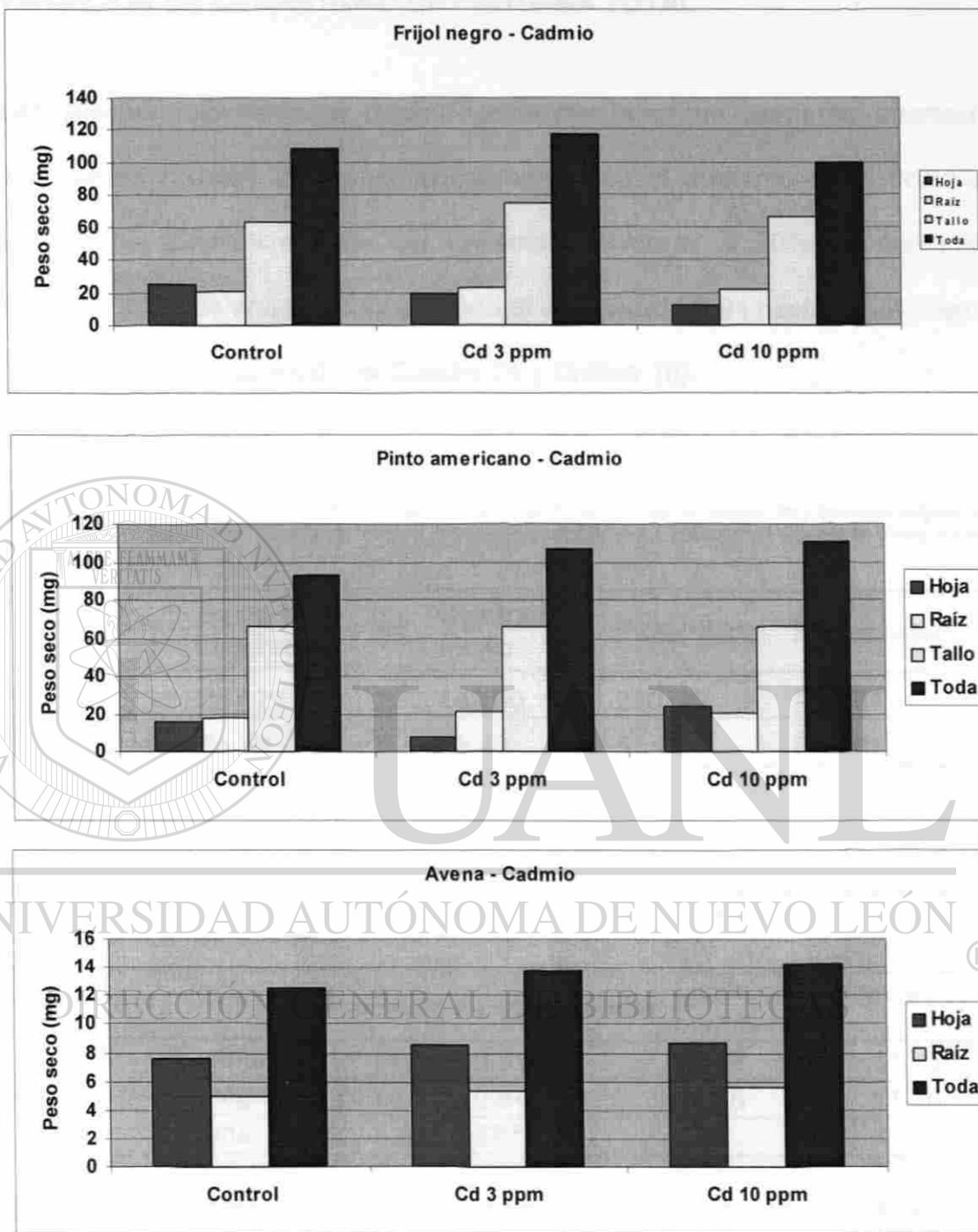
Los valores de de peso seco de las plantas sometidas a Cadmio se registran en los Cuadros 21 y 22. Se observa un aumento ligero en el peso seco total en el rango de concentración experimental de Cadmio aplicado en el sustrato desde 93.2 mg/planta hasta 110.5 mg/planta en el frijol pinto americano y de 12.6 a 14.3 mg/planta en la avena (Gráfica 15, superior e inferior). En el frijol negro la producción de biomasa aumenta en la concentración de 3 ppm (117 mg/planta), pero luego cae por debajo del peso seco del control (Gráfica 15, abajo).

Cuadro 21: Peso seco (mg/planta) de plantas de 4 semanas de *Phaseolus vulgaris* var. pinto americano, *P. vulgaris* var. negro expuestas a 3 y 10 ppm Cd en medio nutritivo de Hoagland. Los valores corresponden a una muestra compuesta de 30 individuos.

Especie	Conc (ppm)	Hoja	Raíz	Tallo	Toda
Pinto americano	Control	16.03	17.77	65.82	93.18
	3 ppm	7.44	21.11	66.44	106.69
	10 ppm	23.92	20.27	66.31	110.50
Frijol negro	Control	24.51	20.15	63.45	108.12
	3 ppm	19.83	23.07	74.65	117.55
	10 ppm	11.86	21.72	66.15	99.73

Cuadro 22: Peso seco (mg/planta) de plantas de 4 semanas de *Avena sativa* expuestas a 3 y 10 ppm Cd en medio nutritivo de Hoagland. Los valores corresponden a una muestra compuesta de 30 individuos.

especie	Conc (ppm)	Hoja	Raíz	Toda
Avena	Control	7.62	4.97	12.59
	Cd 3 ppm	8.51	5.28	13.79
	Cd 10 ppm	8.71	5.58	14.29



Gráfica 15: Peso seco en diferentes órganos de plantas de 4 semanas de *Phaseolus vulgaris* var. pinto americano (arriba), *Phaseolus vulgaris* var. negro (medio) y *Avena sativa* expuestas a diferentes concentraciones de Cadmio en medio nutritivo de Hoagland. Muestra de tipo compuesta de n= 30 individuos.

VARIACION EN LA CANTIDAD DE PROTEINA TOTAL

Las plantas expuestas al Cadmio experimentaron un aumento altamente significativo (Cuadro 23) concomitantemente con el aumento en la dosis de tratamiento. Este incremento fue ligeramente superior al 50% del contenido proteico de los controles incrementando el valor desde 6.94 hasta 10.74% en el tratamiento de 10 ppm Cd (ver Cuadro 24 y Gráfica 16).

Cuadro 23: Análisis de varianza multifactorial del contenido de Proteína Total en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. pinto americano, *P. vulgaris* var. negro y *Avena sativa* expuestas a 3 y 10 ppm de Cadmio en medio nutritivo de Hoagland.

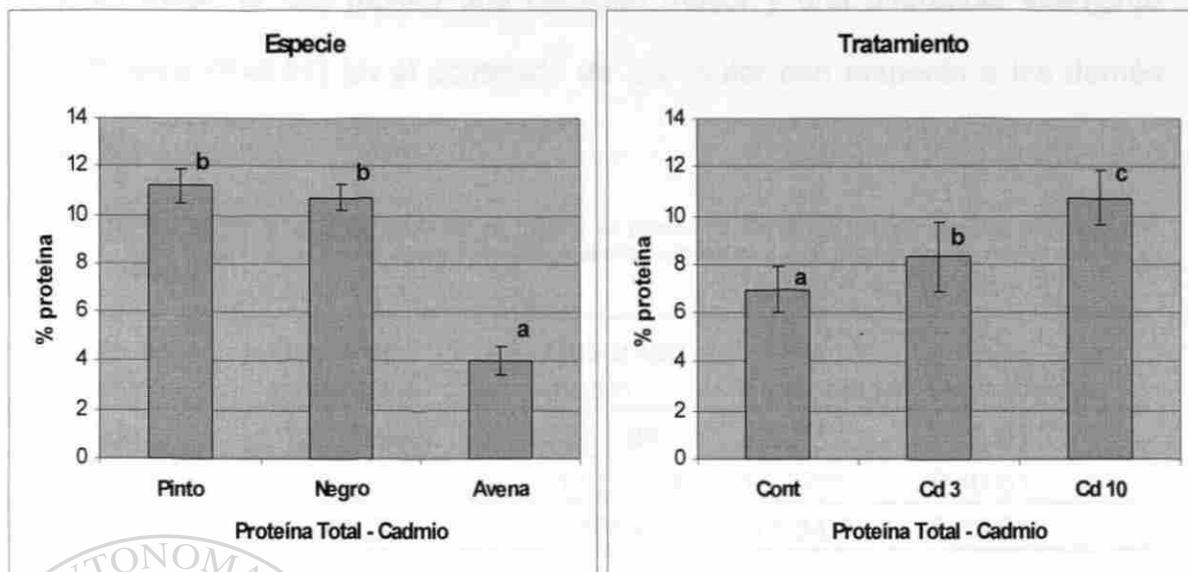
Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F calculada	Probabilidad
Especie	287.20	2	143.60	220.08	P<0.01**
Tratamiento	66.82	2	33.40	51.20	P<0.01**

** indica valores de diferencia altamente significativa (P<0.01); n.s.= no significativa (P>0.5).

Cuadro 24: Comparación múltiple de los valores promedio del contenido de proteína total de las de hojas de *Phaseolus vulgaris* var. pinto americano, *P. vulgaris* var. negro y *Avena sativa* expuestas a 3 y 10 ppm Cd en medio nutritivo de Hoagland mediante la prueba de Tukey.

Nivel		Promedio ± Error estándar	Límite de confianza para la media
Especie	F. pinto	1 11.18 ± 0.71 ^b	10.62 11.73
	F. negro	2 10.74 ± 0.54 ^b	10.18 11.30
	Avena	3 4.05 ± 0.57 ^a	3.49 4.61
Tratamiento	Control	1 6.94 ± 0.93 ^a	6.38 7.50
	3 ppm	2 8.29 ± 1.42 ^b	7.73 8.84
	10 ppm	3 10.74 ± 1.14 ^c	10.18 11.30

Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.01).



Gráfica 16: Contenido de proteína total en *Phaseolus vulgaris* var. pinto americano, *P. vulgaris* var. negro y *Avena sativa* expuestas a diferentes concentraciones de Cadmio en medio nutritivo de Hoagland mediante la prueba de Tukey. Izquierda: en cada especie. Derecha: En cada tratamiento (letras diferentes indican diferencias significativas).

ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE CADMIO

Las especies de cultivo sometidas a 3 y 10 ppm de Cadmio absorbieron cantidades considerables del metal hacia el interior de las plantas hasta cantidades promedio de 45 ppm Cd en la Avena, siendo significativamente diferente a las variedades de frijol, aunque no lo es de la alfalfa. La avena fue la especie que mayormente acumuló el metal en sus tejidos (Gráfica 17). Entre las demás especies con menor absorción de Cd no hubo diferencias significativas entre sus valores promedio.

Tampoco se observó diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre los tratamientos de 3 y 10 ppm Cd en sustrato.

Por su parte, la raíz mostró una cantidad mayor y una diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) en el contenido de Cd tisular con respecto a los demás órganos.

Cuadro 25: Análisis de varianza del contenido de Cadmio en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. pinto americano, *P. vulgaris* var. negro, *Avena sativa* y *Medicago sativa* expuestas a 3 y 10 ppm Cd en medio nutritivo de Hoagland.

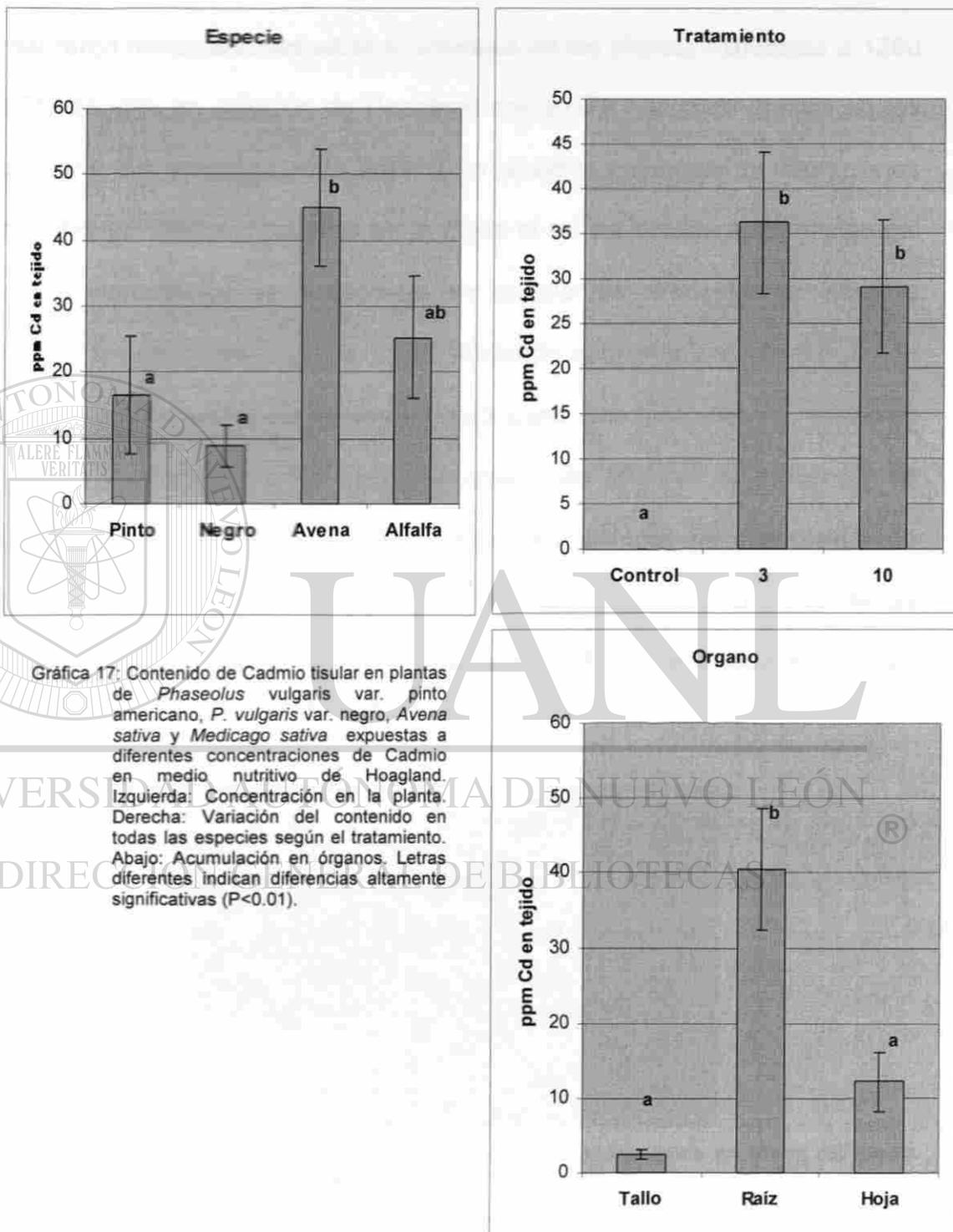
Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F calculada	Probabilidad
Especie	10025.643	3	3341.88	4.87**	$P < 0.01$
Tratamiento	22471.09	2	11235.54	16.37**	$P < 0.01$
Componente	15563.662	2	7781.83	11.34**	$P < 0.01$

** indica valores de diferencia altamente significativa ($P < 0.01$); n.s. = no significativa ($P > 0.5$).

Cuadro 26: Comparación múltiple de los valores promedio del contenido de Cadmio de las partes aéreas y raíces en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. pinto americano, *P. vulgaris* var. negro, *Avena sativa* y *Medicago sativa* expuestas a 3 y 10 ppm Cd en medio nutritivo de Hoagland mediante la prueba de Tukey

Nivel	Promedio ± Error estándar	Límite de confianza para la media		
Especie	F. pinto	16.54 ± 8.80 ^a	6.06	27.03
	F. negro	8.8 ± 3.19 ^a	- .86	18.59
	Avena	45.04 ± 8.86 ^b	26.63	53.21
	Alfalfa	25.27 ± 9.38 ^{ab}	8.12	41.05
	Control	.033 ± .03 ^a	-10.00	9.87
Tratamiento	3 ppm	36.23 ± 7.82 ^b	26.20	46.03
	10 ppm	29.04 ± 7.46 ^b	19.56	43.17
Organo	Tallo	2.44 ± 0.68 ^a	-1.74	26.19
	Raíz	40.50 ± 8.01 ^b	32.28	50.72
	Hoja	12.24 ± 3.94 ^b	4.44	22.97

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.01$).



Gráfica 17: Contenido de Cadmio tisular en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. pinto americano, *P. vulgaris* var. negro, *Avena sativa* y *Medicago sativa* expuestas a diferentes concentraciones de Cadmio en medio nutritivo de Hoagland. Izquierda: Concentración en la planta. Derecha: Variación del contenido en todas las especies según el tratamiento. Abajo: Acumulación en órganos. Letras diferentes indican diferencias altamente significativas ($P < 0.01$).

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION:

Se realizaron observaciones ultraestructurales en las plantas expuestas a 1200 ppm Pb disuelto en solución de Hoagland con EDTA haciendo énfasis en los cloroplastos. Sin embargo, este análisis no reveló la presencia de alteraciones importantes en dichos organelos en la hojas ni en las células epidérmicas del tallo. Los cloroplastos se observaron en las plantas expuestas de aspecto parecido a los controles (Figuras 1 y 2), midiendo aproximadamente 6.5 μm de largo y 2.5 μm de ancho en forma de media Luna. Los tilacoides se mostraron claramente formando granas bien definidas y se observó la presencia de pequeños corpúsculos electrón densos dispersos tanto en los cloroplastos de las plantas control como en las tratadas. Asimismo, la estructura fina de las células del tallo y hoja muestran la organización típica mostrada en plantas normales (Figura 3).

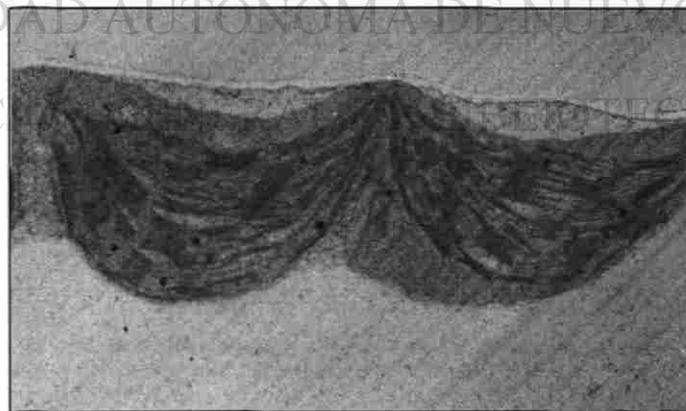


Figura 1: Corte ultrafino de hoja de Alfalfa mostrando cloroplastos en forma de media Luna con tilacoides bien organizados.



Figura 2: Corte ultrafino de tallo de Alfalfa expuesta a 1200 ppm Pb mostrando cloroplastos de a nivel de células endodérmicas. La forma de media Luna con tilacoides bien organizados presente aquí es también típica de cloroplastos en plantas normales.

DISCUSIÓN



Figura 3: Corte transversal de tallo de alfalfa expuesta durante 6 semanas a 1200 ppm Pb en solución nutritiva de Hoagland con EDTA. Nótese la presencia de elementos de floema característicos de células normales.

DISCUSION

La magnificación de metales pesados en los diferentes niveles tróficos debido a la contaminación de suelos por causas antropogénicas trae consecuencias negativas para el desarrollo estable de los ecosistemas así como problemas importantes relacionados con la salud humana. Existen diversos métodos para depurar estos ambientes contaminados, los cuales, aunque son efectivos en la remoción de metales pesados dejan el suelo infértil o en condiciones no propicias para el desarrollo vegetal y animal (ref.). Debido a ello, esta investigación se dirige hacia la búsqueda de especies vegetales que potencialmente puedan ser utilizadas en tecnologías alternativas de remoción de metales pesados sin consecuencias negativas para el ambiente, como la fitorremediación (ref.). Dicha búsqueda se enfocó en plantas silvestres adaptadas a condiciones climáticas extremas y plantas cultivables en regiones semiáridas.

PLANTAS SILVESTRES

Es de gran interés en este trabajo llevar a cabo estudios en especies que estén adaptadas a las condiciones climáticas típicas de la región donde se quiere aplicar la tecnología ecológica pertinente. Es por ello que se trabajó en la búsqueda de especies herbáceas que no sólo presentaran características de tolerancia al estrés metálico, sino que además estén adaptadas a las condiciones climáticas típicas de esta área geográfica. Para que una especie se considere tolerante a los metales pesados, la misma debe ser capaz de

sobrevivir en medios donde el contenido metálico sea abundante (Shaw, 1990; Brooks, 1998). Las plantas que se observaron en los diferentes sitios contaminados crecieron en dichos lugares desde el momento de su germinación, por lo cual, han estado expuestas continuamente a las sustancias químicas que normalmente fluyen al lugar. Ello permite establecer la premisa de que si estas especies crecen en estos sitios es debido a su carácter tolerante a este medio.

Las especies herbáceas predominantemente observadas en las zonas de muestreo pertenecen a las familias Asteraceae, Malvaceae, Gramineaceae, Convolvulaceae y Euphombiaceae, las cuales son plantas de amplia distribución y de una gran variedad taxonómica. Aunque no todas las plantas colectadas pudieron ser identificadas hasta el nivel de especie debido a la carencia de todos los órganos vegetativos, una especie que acumuló elevadas cantidades de metales pesados en su interior pudo ser identificada plenamente:

Malva parviflora. Sobre las especies de *Malva* spp. no existen reportes que indiquen alguna relación con los metales pesados, excepto Ust'ak y Vana (1998) quienes trabajaron con *Malva meluca*.

Todos los individuos colectados mostraron un aspecto fenológico que no permite inferir que presenten síntomas de deterioro por efectos tóxicos de ninguna índole, debido a que presentaban vigor, color y tamaño típicos de plantas normales. A pesar de que se asume que estas plantas han estado en continua exposición a metales pesados, no todas las especies colectadas presentaron cantidades considerablemente elevadas de metales pesados en

sus tejidos internos mientras que, contrariamente, otras especies mostraron cantidades elevadas de unos cuantos metales en su interior. Lo anterior permite inferir que los mecanismos de tolerancia a metales pesados son de naturaleza variable entre las especies y que algunos de estos mecanismos de tolerancia permiten la toma y acumulación de metales en diferentes órganos vegetativos mientras que otros mecanismos evitan la introducción del contaminante a la planta (Tyler et al., 1989). Existen casos en que los mecanismos inclusivos de alguna manera inactivan los efectos nocivos del metal permitiendo su hiperacumulación en los tejidos (Shrivastava y Singh, 1989; Shaw, 1990; Chaney, et al., 1993; Huang y Cunningham, 1996; Punzón y Dickinson, 1997; Robinson, et al., 1998).

El hecho de encontrar plantas tolerantes habitando sitios con importantes contenidos de metales pesados nos permite realizar estudios sobre la naturaleza del suelo del sitio de una manera más precisa analizando la planta

que analizando el suelo directamente. Esto es más evidente en el Área I de muestreo de esta investigación, en el cual, los cambios en las características físico-químicas del agua en el canal efluente eran continuos. Realizar un estudio del contenido de contaminantes en ese sitio a través de muestras puntuales nos da a conocer la composición del suelo en el instante del muestreo, el cual varía con el tiempo. En cambio, el contenido metálico de las plantas acumuladoras da información sobre el contenido histórico promedio del sustrato donde habita, ya que toma del medio una muestra en forma continua de todo elemento que esté pasando por el lugar a lo largo del tiempo de vida de

la planta, convirtiéndose en un sistema bioindicador de contaminación del medio. Es por ello que *Malva parviflora* colectada en los 3 sitios contaminados presentó diferentes niveles de acumulación de metales pesados, debido a que en el suelo de los 3 sitios hubo concentraciones diferentes de los contaminantes presentes. Algunos estudios muestran la existencia de especies en las que la acumulación tisular de metales pesados ocurre en forma proporcional a la concentración de los mismos en el medio, asumiéndose generalmente que a mayor concentración del elemento en la planta, mayor es la concentración en el suelo o sustrato (Robinson et al., 1998). De este modo, debido a que se encontró que *Malva parviflora* contiene cantidades elevadas de metales pesados sin menoscabo aparente de sus funciones biológicas esta planta reúne características que nos permiten proponer a esta especie como probable bioindicador de gran contaminación en el suelo.

Ahora bien, la utilización de especies silvestres trae consigo a menudo una serie de inconvenientes para su propagación y cultivo extensivo; principalmente concernientes con la dificultad en romper el letargo de las semillas para hacerlas germinar en condiciones agronómicas (Mauro et al., 1998). En esta investigación no fue posible encontrar alguna técnica de germinación capaz de romper el letargo de las semillas de *Malva parviflora*. Debido a ello, hasta no encontrar una técnica de propagación apropiada no será posible la aplicación de esta especie en estrategias de fitorremediación, por lo que se sugiere mayor investigación en este sentido. Sin embargo, una alternativa de uso de esta

especie sería mediante el trasplante de individuos ya establecidos a los sitios de aplicación.

Los individuos de esta especie que fueron trasplantados y expuestos a alta concentración de Plomo en el sustrato continuaron creciendo normalmente durante el transcurso del periodo de tiempo del experimento. Sin embargo, a pesar de transportar gran cantidad de Cadmio hacia las partes aéreas, las plantas pronto desarrollaron síntomas letales de toxicidad. Estos resultados señalan que *Malva parviflora* posee una tolerancia alta al Pb y nula al Cd.

En el caso del plomo, una gran concentración del metal es absorbida hacia el interior de la raíz, quedando retenido en este órgano en su mayor parte. Sin embargo, una porción metálica considerable es transportada hacia las partes aéreas, donde se acumula sin causar daño aparente. Resultados similares fueron encontrados en otras especies (Singh et al., 1997; Xiong, 1998)

La observación de que las plantas más jóvenes o de menor tamaño presentaron mayor contenido de Plomo que aquellas de mayor tamaño o edad indica que la capacidad de absorción y retención de Plomo va a depender del grado de maduración de la misma. Los resultados muestran que esta diferencia se debe principalmente a que las plantas jóvenes transportan al Plomo absorbido por la raíz hacia las partes aéreas en forma mucho más eficiente que las plantas maduras. No obstante, la capacidad de absorción por la raíz no se ve significativamente alterada con la edad de la planta ya que ambos grupos de edades no mostraron diferencia significativa en el contenido de Plomo radicular.

Esta observación de que el Plomo es absorbido de igual forma por la raíz en plantas jóvenes y maduras, aunque es transportado hacia las partes aéreas en mayor cantidad en plantas jóvenes es importante para efectos prácticos de fitorremediación ya que si se trata de utilizar a esta especie en algún proyecto de fitoextracción de Plomo, evidentemente se obtendrán logros más rápidos utilizando plantas jóvenes que sean reemplazadas antes de su maduración.

PLANTAS DE CULTIVO

Con el fin de obtener especies que posean características similares a las presentadas por *Malva parviflora* en cuanto a la retención y tolerancia de metales pesados, pero que además posean ventajas agronómicas, se emplearon algunas especies tolerantes cultivables en los suelos y condiciones climáticas del Noreste de México, como fueron la alfalfa, avena, frijol y ciertas gramíneas. Las propiedades hiperacumuladoras de otras especies han sido

reportada en diferentes publicaciones (Cunningham et al., 1995)

PRUEBAS DE GERMINACION

Desafortunadamente, la capacidad germinativa de las semillas de *Medicago sativa* (Alfalfa), *Avena sativa* (Avena) y *Lolium multiflorum* (zacate "Rye Grass") quedó anulada en presencia de medio acuoso de 1000 ppm en cajas de Petri. Probablemente el Plomo en solución acuosa en alta concentración penetra fácilmente en la semilla durante las primeras fases de imbibición inhibiendo así los procesos metabólicos iniciadores de la germinación. En sistemas experimentales donde el Plomo en solución no está directamente disponible por

la semilla, sino solubilizado con EDTA junto a otros iones en medio nutritivo, ésta es capaz de germinar y generar una plántula.

Desde el punto de vista práctico lo anterior es importante debido a que la especie potencialmente útil para fines de fitorremediación debe ser capaz de germinar en el medio contaminado para hacer menos laboriosa su propagación en el sitio, en lugar de tener que ser transplantada y sembrada en el área que se desea tratar, ya que éste sería un proceso más costoso y que retardaría la velocidad de colonización del lugar debido a los daños mecánicos que sufren las plantas durante el proceso de transplante. El proceso más eficiente, rápido y menos laborioso y costoso sería el de propagar extensivamente la especie mediante la siembra de semillas empleando las técnicas de cultivo agronómicas apropiadas, con la precaución de no exponer estos cultivos a su ingesta por animales en la ganadería y humanos.

PRUEBAS DE TOLERANCIA EN PLANTULAS EN CAJAS DE PETRI

A pesar de que las semillas perdieron su capacidad de germinación al ser expuestas a las concentraciones empleadas de Pb y Cd directamente en soluciones acuosas, las plántulas de Alfalfa y Rye Grass originadas de semillas no expuestas a los metales no alteraron su crecimiento ni aspectos cualitativos de coloración y forma en forma notable. Estas plántulas continuaron su desarrollo a pesar de la exposición directa creciendo prácticamente sobre un medio acuoso con una alta concentración de Pb, el cual está disponible en forma directa para ser tomado hacia el interior de la planta a través de la raíz.

En la Avena, por su parte, los efectos tóxicos fueron de los metales fueron evidentes. En este caso, así como en los dos anteriores, las plántulas tratadas germinaron y crecieron hasta formar una biomasa considerable tomando únicamente aquellos nutrientes presentes en el endospermo de las semillas ya que solo se les suministró agua bidestilada en el sustrato. Núñez (2001) reporta una notable disminución de elementos esenciales cuando el suministro de éstos es escaso. Debido a ello, es posible inferir que al iniciar la exposición de metales en las plántulas, éstas ya hayan comenzado a generar respuestas biológicas adversas debidas al estrés nutrimental, por lo cual, las plantas de Avena se hayan hecho más susceptibles a los efectos tóxicos del metal. En contraste, las plántulas de Alfalfa y Rye Grass aún mantienen su capacidad tolerante debido probablemente a un mayor rendimiento en el uso y biotransformación de las sustancias de reserva de sus semillas.

PRUEBAS DE TOLERANCIA AL PLOMO

Las pruebas de tolerancia al Plomo se realizaron en dos niveles que contienen altas concentraciones del metal cada uno. En un nivel el Plomo se le suministró directamente colocando a las plantas en medios con Pb en solución acuosa. En esta forma el Plomo está totalmente disuelto como Pb^{2+} , la cual asumimos que es la forma más disponible para su absorción por parte de la planta, pudiendo pasar libremente a través de los canales iónicos membranoso y probablemente por difusión simple hacia el interior de la raíz a una elevada tasa de absorción. Por otro lado, aunque las cantidades de Plomo presentes en las partes aéreas es elevada, su transporte desde la raíz ocurre a una tasa mucho menor que la

tasa de absorción ya que hay una mayor resistencia a través de los espacios xilemáticos. Además, el Pb^{2+} absorbido se puede ir asociando a los constituyentes celulares a través de enlaces covalentes que no permiten su transporte más allá. Esto genera diferencias significativas entre el contenido de Plomo tisular en la raíz y parte aérea de la planta, siendo mucho mayor en la primera. En este proceso de transporte es importante conocer la presencia o no de proteínas transportadoras de metales originadas por miembros de la familia de genes ZIP (Guerinot, 2000), los cuales transportan una variedad de cationes en el interior de la planta (Williams, et al., 2000).

Un hallazgo interesante ocurre en las plantas tratadas con Plomo solubilizado en solución nutritiva de Shive con EDTA. En estas plantas por lo general se encontraron cantidades de Plomo mucho menores que cuando se suministró en solución acuosa directamente. En estas condiciones la absorción de Plomo es mucho menor debido a que el metal está asociado por el agente quelante en

una molécula de mucho mayor tamaño y con características químicas que reducen notablemente su paso a través de los canales iónicos membranosos y por difusión simple. En otras palabras, se reduce la biodisponibilidad del Plomo en relación al Pb^{2+} libre en solución acuosa. Pero lo interesante del caso no es tanto lo anterior, sino el hallazgo de que bajo estas condiciones el Plomo absorbido por la raíz es transportado hacia las partes aéreas a una mayor rapidez que la tasa de absorción por la raíz. Es por ello que invariablemente se observaron cantidades mayores de Plomo en las partes aéreas que en la raíz cuando éste se suministró con EDTA. La forma Pb-EDTA está menos

disponible de ser captada y retenida por los constituyentes tisulares a su paso por los espacios xilemáticos, por lo que su transportación hacia las hojas ocurre de forma más rápida. La tasa de absorción incrementada mediante la adición de EDTA al medio ha sido observada en otras especies (Huang y Cunningham, 1996; Blaylock et al., 1997). La importancia del papel del agente quelante ha quedado manifiesta en las observaciones de Vassil et al. (1998), quienes demostraron que la mayor parte del Pb en los espacios xilemáticos viene en forma asociada con el EDTA en la mostaza india cultivada hidropónicamente. Estos autores además reportan que hay una concentración umbral de EDTA de 0.25 mM en la solución nutritiva a partir de la cual se estimula la acumulación drástica de Pb en las partes aéreas de la planta. La mayor absorción y transporte de Plomo se ha observado también en suelos conteniendo lodos activados tratados con EDTA (Ust'ak y Vana, 1998).

En suelos contaminados con Plomo, el metal se encuentra en su mayor parte asociado a los constituyentes arcillosos que componen el material de dicho suelo. Por lo tanto, estas formas de Plomo no son biodisponibles para la planta ya que ésta es capaz de absorber únicamente el Plomo que está en solución en el medio húmedo del suelo. La adición de EDTA al suelo que se vaya a tratar con vegetación desprende al Plomo del material arcilloso y lo solubiliza en su fase acuosa, aumentando así su biodisponibilidad en la rizósfera (Huang y Cunningham, 1996). De este modo, el EDTA en este sistema juega un doble papel ya que por un lado aumenta la biodisponibilidad del Plomo en suelos y además aumenta la tasa de translocación del metal absorbido hacia las partes

aéreas, lo cual es favorable en aquellas estrategias de fitoextracción de metales mediante el cosechamiento y disposición de las partes aéreas.

Las plantas de Alfalfa, Avena y Rye Grass que fueron expuestas a soluciones acuosas de Nitrato de Plomo conteniendo 1000 y 5000 ppm Pb no sufrieron efectos dañinos importantes en la fenología y en el crecimiento ya que su tamaño no es significativamente diferente al de los controles. Estos resultados concuerdan con los reportados por Tiemann, et al. (1997) quienes hallaron concentraciones de hasta 43 mg Pb/g peso seco en la alfalfa sin que las plantas sufrieran daños letales. Las mismas fueron capaces de absorber el metal hacia el interior de las raíces y lo transportaron hacia los tejidos de la parte aérea sin menoscabo aparente de sus funciones vitales. La acumulación de Plomo a estos niveles ocurre junto a una estimulación del crecimiento, lo cual es probable que ocurra debido a un aumento en la concentración de Nitrógeno disponible por la solución de Nitrato de Plomo suministrada

experimentalmente. Estos hallazgos coinciden con los resultados similares reportados por Singh et al., 1997; Ita et al., 1998 y Xiong, 1998. A concentraciones de 5000 ppm Pb las plantas se ven afectadas y mostraron un menor crecimiento. Lo anterior indica que en estas especies existe un alto nivel de tolerancia al Pb con elevados límites superiores a partir de los cuales aparecen efectos tóxicos que merman el normal desarrollo de la planta. La planta con mayor capacidad de acumular Pb en sus tejidos a partir de la exposición directa a una solución acuosa del metal resultó ser el Rye Grass, conteniendo en la raíz hasta valores cercanos al 3% de su peso seco. Sin

embargo, aunque no se mostraron resultados estadísticamente diferentes, generalmente se observó que a mayores concentraciones de Plomo en el sustrato, la absorción fue menor, obteniéndose una tendencia general a disminuir el contenido de Plomo total en la planta cuando se exponen a 5000 ppm. Este resultado indica que los efectos nocivos del Plomo en los tejidos aparecen rápidamente cuando las concentraciones en el sustrato son excesivas, produciéndose la correspondiente disminución en los procesos metabólicos que conllevan a un menor crecimiento y disminución de los fenómenos de asimilación radicular de elementos y nutrimentos en general. En cambio en las plantas expuestas a 1000 ppm Pb estos sistemas se ven menos severamente afectados por lo que la entrada del metal y su transporte continúa produciéndose concomitantemente con los procesos de absorción de nutrientes normales.

PRUEBAS DE TOLERANCIA AL CADMIO

Una planta expuesta a Cadmio comienza a absorberlo y acumularlo hasta que se generan concentraciones tóxicas tisulares que alteran los procesos fisiológicos vitales de la planta. Las cantidades de Cadmio presentes en el sustrato no pueden ser tan permisibles como aquellas de Plomo ya que el Cadmio tiene un potencial tóxico mayor produciendo efectos letales a concentraciones mucho menores. Por ello en este estudio se emplearon concentraciones bajas de 3 y 10 ppm Cd en el sustrato.

La acumulación de Cadmio observada en las raíces en una proporción mayor que en las partes aéreas es un hallazgo común entre varias investigaciones en diversas especies (Shrivastava & Singh, 1989, Narwal, et al., 1990, Araujo y Pereira, 1997, Guo, 1995). En este estudio la avena resultó ser la especie con mayor capacidad de absorción de Cadmio, aunque esta capacidad es alta también en las demás especies, ya que las plántulas pudieron captar el metal y acumularlo en concentraciones superiores a las del medio de donde lo tomaron. Otros autores han reportado concentraciones elevadas de Cadmio en sus tejidos por encima del Cadmio contenido en el sustrato sin efectos biológicos letales (Tiemann, et al., 1997). Sin embargo, a mayor concentración de Cadmio en el sustrato, la capacidad de absorción se va perdiendo, lo cual es una observación también encontrada por Robinson, et al. (1998). Esta pérdida en la capacidad de absorción es debido probablemente a una hipertrofia de los canales iónicos que utiliza el metal para su entrada. De este modo, al haber

menor cantidad de canales disponibles debido al "shock" metálico a concentraciones mayores, el Cadmio penetra a la planta en menor cantidad, obteniéndose así una menor concentración de Cd tisular en los tratamientos con mayor concentración.

Por otro lado, es conocido que la presencia de Cadmio es un fuerte activador de las fitoquelatinas (Zenk, 2000). Sin embargo el proceso de síntesis de las enzimas involucradas en la producción de fitoquelatinas tiene un tiempo de activación (Scheller, et al., 1987; Es así como a concentraciones menores, la tasa de absorción es menor y la activación de las fitoquelatinas se da en un

tiempo suficiente para contrarrestar los efectos nocivos del Cadmio invasor. Sin embargo, a concentraciones elevadas el Cadmio penetra más rápidamente y los efectos nocivos aparecen tempranamente debido a que el Cadmio está libre en el tejido a causa del retardo natural en la producción de fitoquelatinas. Al ocurrir los efectos nocivos se alteran también de alguna manera los procesos fisiológicos involucrados en la absorción de nutrientes, por lo que la entrada de Cadmio también se ve disminuida y por lo tanto se observa una menor acumulación del metal a concentraciones mayores en el sustrato (Brooks, 1998).

Los efectos producidos en dosis únicas de elevada concentración en esta investigación podrían prevenirse dando tiempo a que se activen los procesos de tolerancia. En otras investigaciones se ha observado que es posible disminuir los efectos nocivos producidos por una exposición drástica al metal mediante algún proceso de aclimatación previa (Punzón y Dickinson, 1997). Estos

autores señalan que incrementos graduales en la concentración de Cadmio en la solución del sustrato resultan en una notable disminución en los efectos fitotóxicos del metal. La aclimatación es un fenómeno que no siempre ocurre ya que hay especies que no desarrollan tolerancia mediante este proceso (Huebert y Shay, 1993).

En esta investigación se observó que el Cadmio también activó la producción de proteína total en forma proporcional a la concentración en el sustrato, mientras que en forma similar se incrementó la producción de biomasa. Sin embargo, las variaciones en producción de biomasa generalmente se vieron

más afectadas en las hojas o partes aéreas, mientras que la raíz mostró pesos secos más homogéneos entre los tratamientos en todas las especies. Resultados similares encontraron Bhardwaj y Mascarenjas (1989), quienes reportan una disminución drástica en el área foliar de *Triticum aestivum*. En este sentido, la especie *Phaseolus vulgaris* fue la que menos tolerancia mostró debido a que a concentraciones mayores su crecimiento se vio afectado negativamente, mientras que en las demás especies el crecimiento se estimuló. Resultados similares encontraron Chaoui et al. (1997) en cuanto a una disminución en la biomasa del tallo sin gran afectación en el peso de la raíz en plantas de la misma especie (*Phaseolus vulgaris*) expuestas a Cadmio bajo condiciones hidropónicas. En contraste, a pesar de que la avena fue la especie con mayor captación de Cadmio, su crecimiento fue mayor y el contenido de proteína total se duplicó.

Las especies *Medicago sativa* L., *Avena sativa* L., *Lolium multiflorum* Lam.,

Phaseolus vulgaris L. var. pinto americano y *P. vulgaris* L. var. negro son capaces de acumular cantidades de Plomo y Cadmio considerables a nivel de plántula sin producir efectos letales en el organismo. Sin embargo, la disminución en el contenido de clorofila y producción de biomasa a las mayores concentraciones empleadas es señal de que las condiciones de crecimiento y desarrollo están siendo alteradas negativamente y podría traer consecuencias negativas en plazos posteriores. De este modo se requieren estudios para determinar el tiempo útil de estas especies para las actividades de fitorremediación y así establecer el tiempo de cosecha (Robinson, 1998).

DISCUSION

La magnificación de metales pesados en los diferentes niveles tróficos debido a la contaminación de suelos por causas antropogénicas trae consecuencias negativas para el desarrollo estable de los ecosistemas así como problemas importantes relacionados con la salud humana. Existen diversos métodos para depurar estos ambientes contaminados, los cuales, aunque son efectivos en la remoción de metales pesados dejan el suelo infértil o en condiciones no propicias para el desarrollo vegetal y animal (ref.). Debido a ello, esta investigación se dirige hacia la búsqueda de especies vegetales que potencialmente puedan ser utilizadas en tecnologías alternativas de remoción de metales pesados sin consecuencias negativas para el ambiente, como la fitorremediación (ref.). Dicha búsqueda se enfocó en plantas silvestres adaptadas a condiciones climáticas extremas y plantas cultivables en regiones semiáridas.

PLANTAS SILVESTRES

Es de gran interés en este trabajo llevar a cabo estudios en especies que estén adaptadas a las condiciones climáticas típicas de la región donde se quiere aplicar la tecnología ecológica pertinente. Es por ello que se trabajó en la búsqueda de especies herbáceas que no sólo presentaran características de tolerancia al estrés metálico, sino que además estén adaptadas a las condiciones climáticas típicas de esta área geográfica. Para que una especie se considere tolerante a los metales pesados, la misma debe ser capaz de

sobrevivir en medios donde el contenido metálico sea abundante (Shaw, 1990; Brooks, 1998). Las plantas que se observaron en los diferentes sitios contaminados crecieron en dichos lugares desde el momento de su germinación, por lo cual, han estado expuestas continuamente a las sustancias químicas que normalmente fluyen al lugar. Ello permite establecer la premisa de que si estas especies crecen en estos sitios es debido a su carácter tolerante a este medio.

Las especies herbáceas predominantemente observadas en las zonas de muestreo pertenecen a las familias Asteraceae, Malvaceae, Gramineaceae, Convolvulaceae y Euphombiaceae, las cuales son plantas de amplia distribución y de una gran variedad taxonómica. Aunque no todas las plantas colectadas pudieron ser identificadas hasta el nivel de especie debido a la carencia de todos los órganos vegetativos, una especie que acumuló elevadas cantidades de metales pesados en su interior pudo ser identificada plenamente:

Malva parviflora. Sobre las especies de *Malva* spp. no existen reportes que indiquen alguna relación con los metales pesados, excepto Ust'ak y Vana (1998) quienes trabajaron con *Malva meluca*.

Todos los individuos colectados mostraron un aspecto fenológico que no permite inferir que presenten síntomas de deterioro por efectos tóxicos de ninguna índole, debido a que presentaban vigor, color y tamaño típicos de plantas normales. A pesar de que se asume que estas plantas han estado en continua exposición a metales pesados, no todas las especies colectadas presentaron cantidades considerablemente elevadas de metales pesados en

sus tejidos internos mientras que, contrariamente, otras especies mostraron cantidades elevadas de unos cuantos metales en su interior. Lo anterior permite inferir que los mecanismos de tolerancia a metales pesados son de naturaleza variable entre las especies y que algunos de estos mecanismos de tolerancia permiten la toma y acumulación de metales en diferentes órganos vegetativos mientras que otros mecanismos evitan la introducción del contaminante a la planta (Tyler et al., 1989). Existen casos en que los mecanismos inclusivos de alguna manera inactivan los efectos nocivos del metal permitiendo su hiperacumulación en los tejidos (Shrivastava y Singh, 1989; Shaw, 1990; Chaney, et al., 1993; Huang y Cunningham, 1996; Punzón y Dickinson, 1997; Robinson, et al., 1998).

El hecho de encontrar plantas tolerantes habitando sitios con importantes contenidos de metales pesados nos permite realizar estudios sobre la naturaleza del suelo del sitio de una manera más precisa analizando la planta

que analizando el suelo directamente. Esto es más evidente en el Area I de muestreo de esta investigación, en el cual, los cambios en las características físico-químicas del agua en el canal efluente eran continuos. Realizar un estudio del contenido de contaminantes en ese sitio a través de muestras puntuales nos da a conocer la composición del suelo en el instante del muestreo, el cual varía con el tiempo. En cambio, el contenido metálico de las plantas acumuladoras da información sobre el contenido histórico promedio del sustrato donde habita, ya que toma del medio una muestra en forma continua de todo elemento que esté pasando por el lugar a lo largo del tiempo de vida de

la planta, convirtiéndose en un sistema bioindicador de contaminación del medio. Es por ello que *Malva parviflora* colectada en los 3 sitios contaminados presentó diferentes niveles de acumulación de metales pesados, debido a que en el suelo de los 3 sitios hubo concentraciones diferentes de los contaminantes presentes. Algunos estudios muestran la existencia de especies en las que la acumulación tisular de metales pesados ocurre en forma proporcional a la concentración de los mismos en el medio, asumiéndose generalmente que a mayor concentración del elemento en la planta, mayor es la concentración en el suelo o sustrato (Robinson et al., 1998). De este modo, debido a que se encontró que *Malva parviflora* contiene cantidades elevadas de metales pesados sin menoscabo aparente de sus funciones biológicas esta planta reúne características que nos permiten proponer a esta especie como probable bioindicador de gran contaminación en el suelo.

Ahora bien, la utilización de especies silvestres trae consigo a menudo una serie de inconvenientes para su propagación y cultivo extensivo; principalmente concernientes con la dificultad en romper el letargo de las semillas para hacerlas germinar en condiciones agronómicas (Mauro et al., 1998). En esta investigación no fue posible encontrar alguna técnica de germinación capaz de romper el letargo de las semillas de *Malva parviflora*. Debido a ello, hasta no encontrar una técnica de propagación apropiada no será posible la aplicación de esta especie en estrategias de fitorremediación, por lo que se sugiere mayor investigación en este sentido. Sin embargo, una alternativa de uso de esta

especie sería mediante el trasplante de individuos ya establecidos a los sitios de aplicación.

Los individuos de esta especie que fueron transplantados y expuestos a alta concentración de Plomo en el sustrato continuaron creciendo normalmente durante el transcurso del período de tiempo del experimento. Sin embargo, a pesar de transportar gran cantidad de Cadmio hacia las partes aéreas, las plantas pronto desarrollaron síntomas letales de toxicidad. Estos resultados señalan que *Malva parviflora* posee una tolerancia alta al Pb y nula al Cd.

En el caso del plomo, una gran concentración del metal es absorbida hacia el interior de la raíz, quedando retenido en este órgano en su mayor parte. Sin embargo, una porción metálica considerable es transportada hacia las partes aéreas, donde se acumula sin causar daño aparente. Resultados similares fueron encontrados en otras especies (Singh et al., 1997; Xiong, 1998)

La observación de que las plantas más jóvenes o de menor tamaño presentaron mayor contenido de Plomo que aquellas de mayor tamaño o edad indica que la capacidad de absorción y retención de Plomo va a depender del grado de maduración de la misma. Los resultados muestran que esta diferencia se debe principalmente a que las plantas jóvenes transportan al Plomo absorbido por la raíz hacia las partes aéreas en forma mucho más eficiente que las plantas maduras. No obstante, la capacidad de absorción por la raíz no se ve significativamente alterada con la edad de la planta ya que ambos grupos de edades no mostraron diferencia significativa en el contenido de Plomo radicular.

Esta observación de que el Plomo es absorbido de igual forma por la raíz en plantas jóvenes y maduras, aunque es transportado hacia las partes aéreas en mayor cantidad en plantas jóvenes es importante para efectos prácticos de fitorremediación ya que si se trata de utilizar a esta especie en algún proyecto de fitoextracción de Plomo, evidentemente se obtendrán logros más rápidos utilizando plantas jóvenes que sean reemplazadas antes de su maduración.

PLANTAS DE CULTIVO

Con el fin de obtener especies que posean características similares a las presentadas por *Malva parviflora* en cuanto a la retención y tolerancia de metales pesados, pero que además posean ventajas agronómicas, se emplearon algunas especies tolerantes cultivables en los suelos y condiciones climáticas del Noreste de México, como fueron la alfalfa, avena, frijol y ciertas gramíneas. Las propiedades hiperacumuladoras de otras especies han sido reportada en diferentes publicaciones (Cunningham et al., 1995)

PRUEBAS DE GERMINACION

Desafortunadamente, la capacidad germinativa de las semillas de *Medicago sativa* (Alfalfa), *Avena sativa* (Avena) y *Lolium multiflorum* (zacate "Rye Grass") quedó anulada en presencia de medio acuoso de 1000 ppm en cajas de Petri. Probablemente el Plomo en solución acuosa en alta concentración penetra fácilmente en la semilla durante las primeras fases de imbibición inhibiendo así los procesos metabólicos iniciadores de la germinación. En sistemas experimentales donde el Plomo en solución no está directamente disponible por

la semilla, sino solubilizado con EDTA junto a otros iones en medio nutritivo, ésta es capaz de germinar y generar una plántula.

Desde el punto de vista práctico lo anterior es importante debido a que la especie potencialmente útil para fines de fitorremediación debe ser capaz de germinar en el medio contaminado para hacer menos laboriosa su propagación en el sitio, en lugar de tener que ser transplantada y sembrada en el área que se desea tratar, ya que éste sería un proceso más costoso y que retardaría la velocidad de colonización del lugar debido a los daños mecánicos que sufren las plantas durante el proceso de trasplante. El proceso más eficiente, rápido y menos laborioso y costoso sería el de propagar extensivamente la especie mediante la siembra de semillas empleando las técnicas de cultivo agronómicas apropiadas, con la precaución de no exponer estos cultivos a su ingesta por animales en la ganadería y humanos.

PRUEBAS DE TOLERANCIA EN PLANTULAS EN CAJAS DE PETRI

A pesar de que las semillas perdieron su capacidad de germinación al ser expuestas a las concentraciones empleadas de Pb y Cd directamente en soluciones acuosas, las plántulas de Alfalfa y Rye Grass originadas de semillas no expuestas a los metales no alteraron su crecimiento ni aspectos cualitativos de coloración y forma en forma notable. Estas plántulas continuaron su desarrollo a pesar de la exposición directa creciendo prácticamente sobre un medio acuoso con una alta concentración de Pb, el cual está disponible en forma directa para ser tomado hacia el interior de la planta a través de la raíz.

En la Avena, por su parte, los efectos tóxicos fueron de los metales fueron evidentes. En este caso, así como en los dos anteriores, las plántulas tratadas germinaron y crecieron hasta formar una biomasa considerable tomando únicamente aquellos nutrientes presentes en el endospermo de las semillas ya que solo se les suministró agua bidestilada en el sustrato. Núñez (2001) reporta una notable disminución de elementos esenciales cuando el suministro de éstos es escaso. Debido a ello, es posible inferir que al iniciar la exposición de metales en las plántulas, éstas ya hayan comenzado a generar respuestas biológicas adversas debidas al estrés nutrimental, por lo cual, las plantas de Avena se hayan hecho más susceptibles a los efectos tóxicos del metal. En contraste, las plántulas de Alfalfa y Rye Grass aún mantienen su capacidad tolerante debido probablemente a un mayor rendimiento en el uso y biotransformación de las sustancias de reserva de sus semillas.

PRUEBAS DE TOLERANCIA AL PLOMO

Las pruebas de tolerancia al Plomo se realizaron en dos niveles que contienen altas concentraciones del metal cada uno. En un nivel el Plomo se le suministró directamente colocando a las plantas en medios con Pb en solución acuosa. En esta forma el Plomo está totalmente disuelto como Pb^{2+} , la cual asumimos que es la forma más disponible para su absorción por parte de la planta, pudiendo pasar libremente a través de los canales iónicos membranosos y probablemente por difusión simple hacia el interior de la raíz a una elevada tasa de absorción. Por otro lado, aunque las cantidades de Plomo presentes en las partes aéreas es elevada, su transporte desde la raíz ocurre a una tasa mucho menor que la

tasa de absorción ya que hay una mayor resistencia a través de los espacios xilemáticos. Además, el Pb^{2+} absorbido se puede ir asociando a los constituyentes celulares a través de enlaces covalentes que no permiten su transporte más allá. Esto genera diferencias significativas entre el contenido de Plomo tisular en la raíz y parte aérea de la planta, siendo mucho mayor en la primera. En este proceso de transporte es importante conocer la presencia o no de proteínas transportadoras de metales originadas por miembros de la familia de genes ZIP (Guerinot, 2000), los cuales transportan una variedad de cationes en el interior de la planta (Williams, et al., 2000).

Un hallazgo interesante ocurre en las plantas tratadas con Plomo solubilizado en solución nutritiva de Shive con EDTA. En estas plantas por lo general se encontraron cantidades de Plomo mucho menores que cuando se suministró en solución acuosa directamente. En estas condiciones la absorción de Plomo es mucho menor debido a que el metal está asociado por el agente quelante en

una molécula de mucho mayor tamaño y con características químicas que reducen notablemente su paso a través de los canales iónicos membranosos y por difusión simple. En otras palabras, se reduce la biodisponibilidad del Plomo en relación al Pb^{2+} libre en solución acuosa. Pero lo interesante del caso no es tanto lo anterior, sino el hallazgo de que bajo estas condiciones el Plomo absorbido por la raíz es transportado hacia las partes aéreas a una mayor rapidez que la tasa de absorción por la raíz. Es por ello que invariablemente se observaron cantidades mayores de Plomo en las partes aéreas que en la raíz cuando éste se suministró con EDTA. La forma Pb-EDTA está menos

disponible de ser captada y retenida por los constituyentes tisulares a su paso por los espacios xilemáticos, por lo que su transportación hacia las hojas ocurre de forma más rápida. La tasa de absorción incrementada mediante la adición de EDTA al medio ha sido observada en otras especies (Huang y Cunningham, 1996; Blaylock et al., 1997). La importancia del papel del agente quelante ha quedado manifiesta en las observaciones de Vassil et al. (1998), quienes demostraron que la mayor parte del Pb en los espacios xilemáticos viene en forma asociada con el EDTA en la mostaza india cultivada hidropónicamente. Estos autores además reportan que hay una concentración umbral de EDTA de 0.25 mM en la solución nutritiva a partir de la cual se estimula la acumulación drástica de Pb en las partes aéreas de la planta. La mayor absorción y transporte de Plomo se ha observado también en suelos conteniendo lodos activados tratados con EDTA (Ust'ak y Vana, 1998).

En suelos contaminados con Plomo, el metal se encuentra en su mayor parte asociado a los constituyentes arcillosos que componen el material de dicho suelo. Por lo tanto, estas formas de Plomo no son biodisponibles para la planta ya que ésta es capaz de absorber únicamente el Plomo que está en solución en el medio húmedo del suelo. La adición de EDTA al suelo que se vaya a tratar con vegetación desprende al Plomo del material arcilloso y lo solubiliza en su fase acuosa, aumentando así su biodisponibilidad en la rizósfera (Huang y Cunningham, 1996). De este modo, el EDTA en este sistema juega un doble papel ya que por un lado aumenta la biodisponibilidad del Plomo en suelos y además aumenta la tasa de translocación del metal absorbido hacia las partes

aéreas, lo cual es favorable en aquellas estrategias de fitoextracción de metales mediante el cosechamiento y disposición de las partes aéreas.

Las plantas de Alfalfa, Avena y Rye Grass que fueron expuestas a soluciones acuosas de Nitrato de Plomo conteniendo 1000 y 5000 ppm Pb no sufrieron efectos dañinos importantes en la fenología y en el crecimiento ya que su tamaño no es significativamente diferente al de los controles. Estos resultados concuerdan con los reportados por Tiemann, et al. (1997) quienes hallaron concentraciones de hasta 43 mg Pb/g peso seco en la alfalfa sin que las plantas sufrieran daños letales. Las mismas fueron capaces de absorber el metal hacia el interior de las raíces y lo transportaron hacia los tejidos de la parte aérea sin menoscabo aparente de sus funciones vitales. La acumulación de Plomo a estos niveles ocurre junto a una estimulación del crecimiento, lo cual es probable que ocurra debido a un aumento en la concentración de Nitrógeno disponible por la solución de Nitrato de Plomo suministrada

experimentalmente. Estos hallazgos coinciden con los resultados similares reportados por Singh et al., 1997; Ita et al., 1998 y Xiong, 1998. A concentraciones de 5000 ppm Pb las plantas se ven afectadas y mostraron un menor crecimiento. Lo anterior indica que en estas especies existe un alto nivel de tolerancia al Pb con elevados límites superiores a partir de los cuales aparecen efectos tóxicos que merman el normal desarrollo de la planta. La planta con mayor capacidad de acumular Pb en sus tejidos a partir de la exposición directa a una solución acuosa del metal resultó ser el Rye Grass, conteniendo en la raíz hasta valores cercanos al 3% de su peso seco. Sin

embargo, aunque no se mostraron resultados estadísticamente diferentes, generalmente se observó que a mayores concentraciones de Plomo en el sustrato, la absorción fue menor, obteniéndose una tendencia general a disminuir el contenido de Plomo total en la planta cuando se exponen a 5000 ppm. Este resultado indica que los efectos nocivos del Plomo en los tejidos aparecen rápidamente cuando las concentraciones en el sustrato son excesivas, produciéndose la correspondiente disminución en los procesos metabólicos que conllevan a un menor crecimiento y disminución de los fenómenos de asimilación radicular de elementos y nutrimentos en general. En cambio en las plantas expuestas a 1000 ppm Pb estos sistemas se ven menos severamente afectados por lo que la entrada del metal y su transporte continúa produciéndose concomitantemente con los procesos de absorción de nutrientes normales.

PRUEBAS DE TOLERANCIA AL CADMIO

Una planta expuesta a Cadmio comienza a absorberlo y acumularlo hasta que se generan concentraciones tóxicas tisulares que alteran los procesos fisiológicos vitales de la planta. Las cantidades de Cadmio presentes en el sustrato no pueden ser tan permisibles como aquellas de Plomo ya que el Cadmio tiene un potencial tóxico mayor produciendo efectos letales a concentraciones mucho menores. Por ello en este estudio se emplearon concentraciones bajas de 3 y 10 ppm Cd en el sustrato.

La acumulación de Cadmio observada en las raíces en una proporción mayor que en las partes aéreas es un hallazgo común entre varias investigaciones en diversas especies (Shrivastava & Singh, 1989, Narwal, et al., 1990, Araujo y Pereira, 1997, Guo, 1995). En este estudio la avena resultó ser la especie con mayor capacidad de absorción de Cadmio, aunque esta capacidad es alta también en las demás especies, ya que las plántulas pudieron captar el metal y acumularlo en concentraciones superiores a las del medio de donde lo tomaron. Otros autores han reportado concentraciones elevadas de Cadmio en sus tejidos por encima del Cadmio contenido en el sustrato sin efectos biológicos letales (Tiemann, et al., 1997). Sin embargo, a mayor concentración de Cadmio en el sustrato, la capacidad de absorción se va perdiendo, lo cual es una observación también encontrada por Robinson, et al. (1998). Esta pérdida en la capacidad de absorción es debido probablemente a una hipertrofia de los canales iónicos que utiliza el metal para su entrada. De este modo, al haber menor cantidad de canales disponibles debido al "shock" metálico a concentraciones mayores, el Cadmio penetra a la planta en menor cantidad, obteniéndose así una menor concentración de Cd tisular en los tratamientos con mayor concentración.

Por otro lado, es conocido que la presencia de Cadmio es un fuerte activador de las fitoquelatinas (Zenk, 2000). Sin embargo el proceso de síntesis de las enzimas involucradas en la producción de fitoquelatinas tiene un tiempo de activación (Scheller, et al., 1987; Es así como a concentraciones menores, la tasa de absorción es menor y la activación de las fitoquelatinas se da en un

tiempo suficiente para contrarrestar los efectos nocivos del Cadmio invasor. Sin embargo, a concentraciones elevadas el Cadmio penetra más rápidamente y los efectos nocivos aparecen tempranamente debido a que el Cadmio está libre en el tejido a causa del retardo natural en la producción de fitoquelatinas. Al ocurrir los efectos nocivos se alteran también de alguna manera los procesos fisiológicos involucrados en la absorción de nutrientes, por lo que la entrada de Cadmio también se ve disminuida y por lo tanto se observa una menor acumulación del metal a concentraciones mayores en el sustrato (Brooks, 1998).

Los efectos producidos en dosis únicas de elevada concentración en esta investigación podrían prevenirse dando tiempo a que se activen los procesos de tolerancia. En otras investigaciones se ha observado que es posible disminuir los efectos nocivos producidos por una exposición drástica al metal mediante algún proceso de aclimatación previa (Punzón y Dickinson, 1997). Estos

autores señalan que incrementos graduales en la concentración de Cadmio en la solución del sustrato resultan en una notable disminución en los efectos fitotóxicos del metal. La aclimatación es un fenómeno que no siempre ocurre ya que hay especies que no desarrollan tolerancia mediante este proceso (Huebert y Shay, 1993).

En esta investigación se observó que el Cadmio también activó la producción de proteína total en forma proporcional a la concentración en el sustrato, mientras que en forma similar se incrementó la producción de biomasa. Sin embargo, las variaciones en producción de biomasa generalmente se vieron

más afectadas en las hojas o partes aéreas, mientras que la raíz mostró pesos secos más homogéneos entre los tratamientos en todas las especies. Resultados similares encontraron Bhardwaj y Mascarenjas (1989), quienes reportan una disminución drástica en el área foliar de *Triticum aestivum*. En este sentido, la especie *Phaseolus vulgaris* fue la que menos tolerancia mostró debido a que a concentraciones mayores su crecimiento se vio afectado negativamente, mientras que en las demás especies el crecimiento se estimuló. Resultados similares encontraron Chaoui et al. (1997) en cuanto a una disminución en la biomasa del tallo sin gran afectación en el peso de la raíz en plantas de la misma especie (*Phaseolus vulgaris*) expuestas a Cadmio bajo condiciones hidropónicas. En contraste, a pesar de que la avena fue la especie con mayor captación de Cadmio, su crecimiento fue mayor y el contenido de proteína total se duplicó.

Las especies *Medicago sativa* L., *Avena sativa* L., *Lolium multiflorum* Lam.,

Phaseolus vulgaris L. var. pinto americano y *P. vulgaris* L var. negro son capaces de acumular cantidades de Plomo y Cadmio considerables a nivel de plántula sin producir efectos letales en el organismo. Sin embargo, la disminución en el contenido de clorofila y producción de biomasa a las mayores concentraciones empleadas es señal de que las condiciones de crecimiento y desarrollo están siendo alteradas negativamente y podría traer consecuencias negativas en plazos posteriores. De este modo se requieren estudios para determinar el tiempo útil de estas especies para las actividades de fitorremediación y así establecer el tiempo de cosecha (Robinson, 1998).

CONCLUSIONES

- Mediante observaciones y colectas de campo de especies vegetales que habitan lugares con suelos visiblemente contaminados es posible obtener especies tolerantes a los compuestos contaminantes allí presentes. De este modo, se pudo determinar que la especie silvestre *Malva parviflora* en etapa joven, a pesar de ser sensible al Cadmio, es capaz de acumular concentraciones elevadas de Plomo en tallo y hoja tanto en suelos contaminados como en condiciones controladas en el laboratorio.
- Con el fin de aprovechar la elevada capacidad de retención de Plomo tisular en *Malva parviflora* en labores de fitoextracción se recomienda la investigación de tecnologías que permitan su cultivo agronómico extensivo.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

- Las especies cultivadas *Medicago sativa* L., *Avena sativa* L., *Phaseolus vulgaris* L. var. pinto americano y *P. vulgaris* L var. negro poseen una capacidad similar de acumular Plomo en cantidades del orden de varios cientos de partes por millón cuando se suministra acompañado con EDTA en presencia de otros iones. Por lo tanto, cualquiera de estas especies posee la misma utilidad potencial de uso en fitorremediación, siendo otros factores, como costo, requerimientos nutritivos, estación

climática, etc., de mayor importancia en la selección de la especie que se va a utilizar en la aplicación de un proyecto específico de fitorremediación.

- En el material vegetal empleado en este trabajo la acumulación de Plomo tisular ocurre en forma proporcional con el contenido metálico en el sustrato, concentrando una porción importante en las hojas (ayudado probablemente por acción del EDTA), por lo cual, estas especies pueden ser utilizadas para extracciones lentas del metal en suelos contaminados. Sin embargo, debido al inicio de respuestas biológicas desfavorables en las concentraciones mayores utilizadas, como la disminución de biomasa y clorofila, estas especies pueden utilizarse sólo en rangos menores a 1000 ppm Pb.

- En las especies tratadas hubo gran variabilidad en la capacidad de acumulación de Cadmio en sus tejidos, siendo la *Avena sativa* la que mayormente acumuló el metal, seguido de *Medicago sativa* y *Phaseolus vulgaris*. Sin embargo, debido a que el Cadmio permaneció retenido en las raíces de estas especies su uso potencial quedaría restringido a estrategias de fitoestabilización.

LITERATURA CONSULTADA

AOAC, 1991. Official Methods of Analysis of the AOAC. 4th Ed. ASSOCIATION OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, Washington, D.C.

Araujo do Nascimento, C.W. & Pereira, J.B.M. 1997. Uptake and distribution of cadmium and micronutrients by bean cultivars to cadmium levels. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 32: 1303-1308.

Assche, F.V., Clijsters, H. & Van-Assche, F. 1990. Effects of metals on Enzyme activity in plants. Plant, Cell and Environment 13: 195-206.

Bhardwaj, R. & Mascarenhas, C. 1989. Cadmium-induced inhibition of photosynthesis in vivo during development of chloroplast in *Triticum aestivum* L. Plant Physiology and Biochemistry 16: 40-48.

Blaylock, M.J., Salt, D.E., Dushenkov, S., Zakharova, O., Gussman, C.,

Kapulnik, Y., Ensley, B.D. & Raskin, I. 1997. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. Environ Sci. Technol. 31: 860-865.

Brooks, R.R. 1998. Plants that hyperaccumulate heavy metals: their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytomining. CAB International, New York, NY

Chaney, R.L, Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Angle, J.S. & Baker, A.J.M.

1997. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinions in Biotechnology* 8: 279-284.

Chaoui, A., Ghorbal, M.H. & El Ferjani, E. 1997. Effects of cadmium-zinc

interactions on hydroponically grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 126: 21-28.

Cunningham, S.D., Berti, W.R. & Huang, J.W. 1995. Phytoremediation of

contaminated soils. *Trends Biotechnol.* 13: 393-397.

Fernández Sánchez, J.M., Ruiz Aguilar, G y Rodríguez Vázquez, R. 1998. La

biorremediación como alternativa al tratamiento de suelos contaminados.

Avance y Perspectiva 17: 293-302.

Foroughbakhch, R., Hauad, L., Maiti, R. K., Rodríguez, M., Hernández

Piñero, J. L., Badii, M.H., Céspedes, A. E. & Ponce Moreno E. E.

2000. Techniques of germination and growth potential of some fuelwood

species in northeastern Mexico. *Phyton* In Press.

Goodwin, T.W. 1976. Chemistry and biochemistry of plant pigments. Vol. 1 & 2.

Academic Press Inc. New York. U.S.A.

Guerinot, M.L. 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et*

Biophysica Acta/Biomembranes, 1465: 190-198.

Punshon, T. & Dickinson, N.M. 1997. Acclimation of *Salix* to metal stress. *New Phytologist* 137: 303-314.

Robinson, B.H., Leblanc, M., Petit, D., Brooks, R.R., Kirkman, J.H. & Gregg, P.E.H. 1998. The potential of *Thlaspi caerulescens* for phytoremediation of contaminated soils. *Plant and Soil* 203: 47-56.

Scheller, H.B., Huang, B., Hatch, E., and Goldsbrough, P.B. 1987.

Phytochelatin synthesis and glutathione levels in response to heavy metals in tomato cells. *Plant Physiol.* 85: 1031-1035.

Shaw, J. 1990. Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects. Library of Congress Cataloging in Publication Data. CRC Press, USA.

Shimp, J.F., Tracy, J.C., Davis, L.C., Lee, E., Huang, W. & Erickson, L.E.

1993. Beneficial effects of plants in the remediation of soil and groundwater contaminated with organic materials. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 23: 41-77.

Shrivastava, G.K. & Singh, V.P. 1989. Uptake, accumulation and translocation of cadmium and zinc in *Abelmoschus esculentus*. *Plant Physiol.*

Biochem. 16: 17-22.

Singh, R.P., Tripathi, R.D., Sinha, S.K., Maheshwari, R. & Srivastava, H.S.

1997. Response of higher plants to lead contaminated environment.

Chemosphere 34: 2467-2493

SNICS 1976. Reglas internacionales para ensayos de semillas. Ministerio de Agricultura, Dirección General de producción Agraria, Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero. Madrid, España.

Spurr A.R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embeddng for electron microscopy. J. Ultrastruct Res. 26:31-43..

Tiemann, K.J., Gardea-Toreesdey, J.L. Gamez, G. Rodríguez O. & Sias, S.

1997. 12th Annual Conference on Hazardous Waste Reseca, Mayo 19-22, Kansas City.

Ust'ak, S. & Vana, J. 1998. Hazardous element transfer from contaminated soils to selected energy plants. Rostlinna vyroba 44: 477-485.

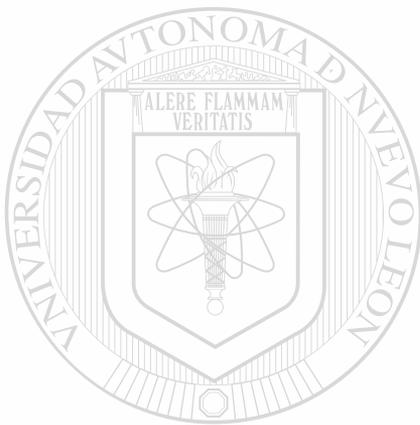
Vassil, A.D., Kapulnik, Y., Raskin, I. & Salt, D.E. 1998. The role of EDTA in lead transport and accumulation by indian mustard. Plant Physiol. 117: 447-453.

Williams, L.E., Pittman, J.K. & may, J.L. (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. Biochimica et Biophysica Acta/Biomembranes 1465: 104-126.

Xiong, Z.T. 1998. Lead Uptake and Effects on Seed Germination and Plant Growth in a Pb hyperaccumulator *Brassica pekinensis* Rupr. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 60: 285-291.

Zar, J.H. 1996. Biostatistical Analysis. Tercera edición. Prentice Hall, Inc. N.Y.

Zenk, M. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants: a review; *Gene* 179:
21-30.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Artículos publicados y/o aprobados:

- 1.- GUTIÉRREZ-LOBATOS, J.L., R.K. MAITI, J.L. HERNÁNDEZ-PIÑERO, R. FOROUBAGHBAKCH, J. VERDE-STAR, S. MARTÍNEZ-LOZANO, M.C. VALADES-CERDA M.W. BORYS, "VARIABILITY AND LEAF SURFACE ULTRASTRUCTURE IN CRATAEGUS PUBESCENS ACCESIONS AND ITS POSSIBLE RELATION TO THE MECANISMS OF ADAPTATION TO DIVERSE ENVIRONMENTAL ", publicado en *Phyton Int. J. Exp. Botany*, vol. 62, pág. 145 a 149, Argentina, 1988
Objetivo: Investigación
Documento: Sobretiro
- 2.- GUTIERREZ J.L.; R.K. MAITI; HERNÁNDEZ- PIÑERO ; R. FOROUGHBAKHCH; A. REYES GARCÍA M.C. VALADES-CERDA., "A PRELIMINARY STUDY ON THE ANATOMY OF THE SECONDARY XYLEM OF HAWTHORN, CRATAERGUS PUBESCENS (H.B.K.) STEUD.", publicado en *J. Nat. Bot. Soc.* 50:101-104., vol. 50, pág. 101 a 104, India, 1999
Objetivo: Investigación
Documento: Sobretiro
- 3.- CÁRDENAS ÁVILA MARÍA LUISA, M.J. VERDE STAR, R.K. MAITI, RAHIM FOROUGHBAKHCH, H. GÁMEZ GZZ, S.J. MARTÍNEZ LOZANO, M.A. NÚÑEZ GZZ, J.L. HERNÁNDEZ PIÑERO, "VARIABILITY IN CALLUS INDUCTION IN VITRO OF FOUR VARIETIES OF BEAN PHASEOLUS VULGARIS L.", aprobado por *Int. J. Exp Botany Phyton*, Argentina, 2000
Objetivo: Investigación
Documentos: Carta de aceptación y Manuscrito
- 4.- R.K. MAITI, MARÍA LUISA CÁRDENAS ÁVILA, M.J. VERDE STAR, J.L. HERNÁNDEZ PIÑERO MA. ADRIANA NÚÑEZ GONZÁLEZ , "TISSUE CULTURE AND ITS APPLICATION IN CROP IMPROVEMENT PROGRAME IN PHASEOLUS BEAN", aprobado por *Agricultural Reviews*, India, 2000
Objetivo: Investigación
Documentos: Carta de aceptación y Manuscrito

- 5.- MA. ADRIANA NÚÑEZ GONZÁLEZ, R.K. MAITI, M.J. VERDE STAR, MARÍA LUISA CÁRDENAS ÁVILA, RAHIM FOROUGHBAKHCH, J.L. HERNÁNDEZ PIÑERO, S. MORENO LIMÓN G. GARCÍA DÍAZ, "VARIABILITY IN MINERAL PROFILE IN SEVEN VARIETIES OF BEAN (PHASEOLUS VULGARIS L.) ADAPTED IN NORTH EAST OF MEXICO", aprobado por Legume Research, India, 2000
Objetivo: Investigación
Documentos: Carta de aceptación y Manuscrito
- 6.- NÚÑEZ GZZ MA. ADRIANA, HEREDIA ROJAS N.L., MAITI R.K., VERDE STAR M.J, MORENO LIMÓN S. ALVAREZ OJEDA M.G., CÁRDENAS ÁVILA M.L, HERNÁNDEZ PIÑERO J.L., "COMPARISON OF THE PROTEIN PROFILES OF FOUR BEAN CULTIVARS (PHASEOLUS VULGARIS L.) SUBJECTED TO LOW NUTRIENT LEVEL : A PRELIMINARY STUDY ". ", enviado a LEGUME RESEARCH, India, 2000
Objetivo: Investigación
Documentos: Carta de recepción y Manuscrito
- 7.- R.K. MAITI, J.G. ALMANZA, J.L. HERNÁNDEZ PIÑERO, SALOMÓN MARTÍNEZ LOZANO, LETICIA VILLARREAL RIVERA, MA. CONCEPCIÓN VALADES AND MARÍA LUISA CÁRDENAS A, "SOME ASPECTS OF THE MORPHOLOGY AND ANATOMY OF THE WILD CHILLI "CHILE PIQUÍN" (CAPSICUM ANNUUM L. VAR. AVICULARE DE., SOLANACEAE) IN NUEVO LEON, MEXICO", aprobado por Biotam, México, 2000
Objetivo: Investigación
Documentos: Carta de aceptación y Manuscrito
- 8.- JAVIER STEEL-RUIZ, R. FOROUGHBAKHCH, J.L. HERNÁNDEZ-PIÑERO, R.K. MAITI, "MICROSCOPIC AND UTRASTRUCTURAL VARIABILITY OF LEAF SURFACE OF EUCALYPTUS SPP. AND ITS POSSIBLE RELATION TO ADAPTATION TO THE SEMIARID ENVIRONMENTS", aprobado por Int. J. Exp Botany Phyton, Argentina, 2000
Objetivo: Investigación
Documentos: Carta de aceptación y Ninguno

- 9.- JAVIER STEEL-RUIZ, R.K. MAITI, RAHIM FOROUGHBAKHCH, AND J.L. HERNÁNDEZ-PIÑERO, "COMPARATIVE ANATOMY OF SECONDARY XYLEM OF EUCALYPTUS SPP. AND ITS POSSIBLE RELATION TO WOOD QUALITY", aprobado por Journal of the National Botanical Society, India, 2000
Objetivo: Investigación
Documentos: Ninguno y Manuscrito
- 10.- IRENE MIR ARAU, R.K. MAITI, J.L. HERNANDEZ-PIÑERO, E. ARANDA, "THE CHANGES OF GLOSSY AND NOGLOSSY SORGHUM GENOTYPES EXPOSED TO SALINITY AND DROUGHT STRESS DURING SEEDLING DEVELOPMENT AND CALLUS GROWTH.", enviado a Indian Journal of Plant Physiology, India, 2000
Objetivo: Investigación
Documentos: Ninguno y Manuscrito
- 11.- FOROUGHBAKHCH, R., L.A. HAUAD, R.K. MAITI, M. RODRÍGUEZ, J.L. HERNÁNDEZ-PIÑERO, M.H. BADIL, A.E. CÉSPEDES E.E. PONCE MORENO, "TECHNIQUES OF GERMINATION AND GROWTH POTENTIAL OF SOME FUELWOOD SPECIES IN NORTHEASTERN MEXICO", aprobado por Int. J. Exp Botany Phytón., Argentina, 2000
Objetivo: Investigación
Documentos: Carta de aceptación y Ninguno
- 12.- FOROUGHBAKHCH, R., R.K. MAITI, J.L. GUTIÉRREZ-LOBATOS, M. BORYS, L.A. HAUAD, J.L. HERNÁNDEZ-PIÑERO, M.H. BADI J.A. ALBA-AVILA, "USES AND MORPHOLOGICAL CHARACTERS OF CRATAEGUS PUBESCENS H.B.K. (ROSACEAE: MALOIDEAE) IN MEXICO.", aprobado por Int. J. Exp Botany Phytón, Argentina, 2000
Objetivo: Investigación
Documentos: Carta de aceptación y Ninguno
- 13.- S. MORENO-LIMÓN, R.K. MAITI, ADRIANA NÚÑEZ GONZÁLEZ, JULIA VERDE STAR, RAHIM FOROUGHBAKHCH, HILDA GÁMEZ-GONZÁLEZ, J.L. HERNÁNDEZ-PIÑERO F. ZAVALA-GARCÍA, "DIFFERENTIAL RESPONSES OF BEAN CULTIVARS (PHASEOLUS VULGARIS L) TO CONTRASTING TEMPERATURES IN MINERAL ACQUISITION AND OTHER PHYSIOLOGICAL TRAITS.", publicado en Crop Research, vol. 19, pág. a, India, 2000
Objetivo: Investigación
Documento: Fotocopia

- 14.- R. FOROUGHBAKHCH, M. RODRÍGUEZ., R.K. MAITI, J.L. HERNÁNDEZ-PIÑERO, L.A. HAUAD A.E. CÉSPEDES., "SEED MORPHOLOGY AND ULTRASTRUCTURE OF EIGHT NATIVE SHRUBS AND TREES OF NORTHEASTERN MÉXICO. ", publicado en INT. J. EXP BOTANY PHYTON, vol. 66, pág. 25 a 31, Argentina, 2000

Objetivo: Investigación

Documento: Sobretiro

- 15.- HAUAD-MARROQUÍN LETICIA A., RAHIM FOROUGHBAKHCH, ABIMAE E. CÉSPEDES, EDNA E PONCE-MORENO J.L. HERNÁNDEZ-PIÑERO, "DISPERSIÓN Y RECLUTAMIENTO DE TRES ESPECIES DE MANGLE EN EL LÍMITE TROPICAL DEL GOLFO DE MÉXICO.", publicado en Int. J. Exp Botany Phyton, vol. 66, pág. 33 a 37, Argentina, 2000

Objetivo: Investigación

Documento: Sobretiro



UANL

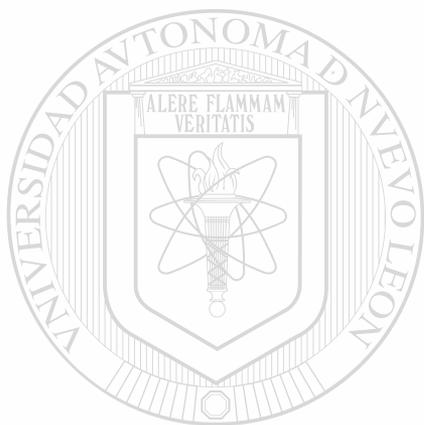
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Artículos in Extenso:

- 1.- ADA MARCELA ITA GARAY, MA. ADRIANA NUÑEZ, MAITI RATIKANTA Y JORGE L. HERNANDEZ PIÑERO., "PHASEOLUS VULGARIS L. VAR. PINTO AMERICANO INDICATOR OF SITES CONTAMINATED WITH LEAD AND CADMIUM.", en INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ENVIRONMENTAL ENGINEERING AND HEALTH SCIENCES: A JOINT EFFORT FOR THE XXI CENTURY., ed. WATER RESORCES PUBLICATIONS, LLC, USA., pág. 425 a 435, México, 1998
Objetivo: Investigación, Documento: Fotocopia



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Desarrollos tecnológicos:

1.- JORGE LUIS HERNANDEZ PIÑERO "SELECCION DE PLANTAS HERBACEAS CON POTENCIAL FITORREMIADOR EN NUEVO LEON."

Aportación: LAS PLANTAS HIPERACUMULADORAS SE PUEDEN UTILIZAR COMO DEPURADORAS DE METALES PESADOS EN SUELOS CONTAMINADOS SEGUN SEA SU MECANISMO DE TOLERANCIA. AL RESPECTO SE HA ENCONTRADO UNA ESPECIE HERBACEA DE LA REGION CON ESTAS CARACTERISTICAS.

Descripción: SE ANALIZAN PLANTAS HERBACEAS QUE SE DESARROLLAN NATURALMENTE EN SITIOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS PARA DETERMINAR SU CAPACIDAD DE ACUMULACION EN TEJIDOS Y SUS MECANISMOS DE TOLERANCIA.

Organismo: UNIVERSTAD AUTONOMA DE NUEVO LEON, México, 1999

Documento: Reporte técnico



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Docencia:

- 1.- Maestría (1998 año), "MICROTECNIA VEGETAL", Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, en México, iniciando en 1996, con duración de SEMESTRAL, (un total de 3 veces impartida).

- 2.- Maestría (1999 año), "MICROTECNIA VEGETAL", Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, en México, iniciando en 1996, con duración de SEMESTRAL, (un total de 3 veces impartida).

- 3.- Maestría (1999 año), "PROTOZOOLOGIA DE ORGANISMOS ACUATICOS", Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, en México, iniciando en 1999, con duración de SEMESTRAL, (un total de 2 veces impartida).

- 4.- Especialidad (1998 año), "SANIDAD ACUICOLA", Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, en México, iniciando en 1998, con duración de 100 HORAS, (un total de 1 veces impartida).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tesis dirigidas:

- 1.- Maestría, MARIA ELENA MONTERO VILLALOBOS, "RESPUESTA ANATOMICA Y ULTRAESTRUCTURAL AL ESTRES DE SALINIDAD EN GENOTIPOS SENSIBLES Y TOLERANTES DE MAIZ (ZEA MAYS L)", Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, en México

Concluida: Si, obtención en 11/1998

- 2.- Maestría, CELINA ROMO GONZALEZ, "ESTRÉS METÁLICO EN PHASEOLUS VULGARIS.", Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, en México

Concluida: No



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

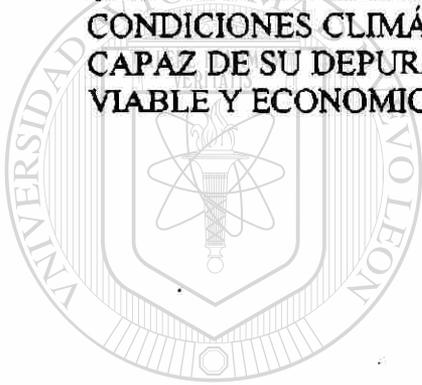
Formación de grupos:

- 1.- JORGE LUIS HERNANDEZ PIÑERO, MARIA JULIA VERDE STAR, RAHIM FOROUGHBAKCH, MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, MARIA LUISA CARDENAS AVILA, GRACIELA GARCIA DÍAZ, SERGIO MORENO LIMON.

Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, México, 1999, permanencia: ANUAL

Objetivo: SELECCION DE PLANTAS CON POTENCIAL FITORREMIADOR.

Impacto: EL ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE FITORREMIACION DE SUELOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS PARTICULARES, ESPECIALMENTE PLOMO Y CADMIO, CON ESPECIES HERBACEAS Y CULTIVABLES EN LAS CONDICIONES CLIMÁTICAS DE LA REGION NORESTE QUE SEA CAPAZ DE SU DEPURACION DE UN MODO EFECTIVO, ECOLOGICO, VIABLE Y ECONOMICO.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

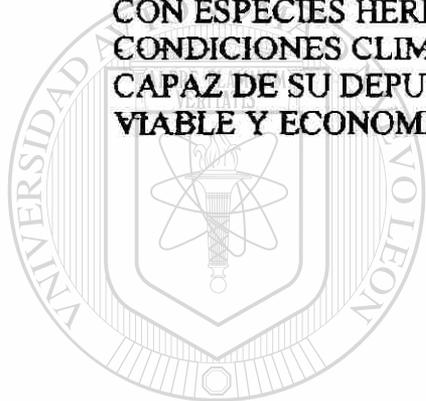
Formación de grupos:

- 1.- JORGE LUIS HERNANDEZ PIÑERO, MARIA JULIA VERDE STAR, RAHIM FOROUGHBAKCH, MARIA ADRIANA NUÑEZ GONZALEZ, MARIA LUISA CARDENAS AVILA, GRACIELA GARCIA DÍAZ, SERGIO MORENO LIMON.

Universidad Autónoma de Nuevo León- Facultad de Ciencias Biológicas, México, 1999, permanencia: ANUAL

Objetivo: SELECCION DE PLANTAS CON POTENCIAL FITORREMIADOR.

Impacto: EL ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE FITORREMIACION DE SUELOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS PARTICULARES, ESPECIALMENTE PLOMO Y CADMIO, CON ESPECIES HERBACEAS Y CULTIVABLES EN LAS CONDICIONES CLIMÁTICAS DE LA REGION NORESTE QUE SEA CAPAZ DE SU DEPURACION DE UN MODO EFECTIVO, ECOLOGICO, VIABLE Y ECONOMICO.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ENVIRONMENTAL ENGINEERING AND HEALTH SCIENCES

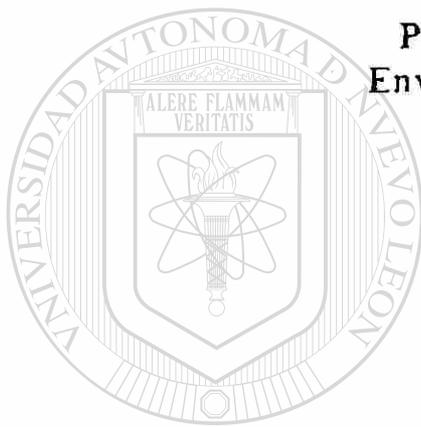
Proceedings of the International Symposium on
Environmental Engineering and Health Sciences: A
Joint Effort for the XXI Century

OCTOBER 26-30, 1995

Cholula, Puebla, MEXICO

Organized by

Universidad de las Americas-Puebla



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Edited by

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Jose A. Raynal, Senior Editor
Universidad de las Americas-Puebla

John R. Nuckols, co-Editor
Colorado State University

Rene Reyes, co-Editor
Universidad de las Americas-Puebla

Mary Ward, co-Editor
U. S. National Cancer Institute

Water Resources Publications, LLC.

For information and correspondence:

Water Resources Publications, LLC
7200 E. Dry Creek Rd., Suite E-104
Englewood, Colorado 80112, USA

ENVIRONMENTAL ENGINEERING AND HEALTH SCIENCES

Proceedings of the International Symposium on
Environmental Engineering and Health Sciences: A Joint
Effort for the XXI Century

OCTOBER 26-30, 1998

Cholula, Puebla, MEXICO

Organized by Universidad de las Americas-Puebla

Edited by

Jose A. Raynal, Senior Editor
Universidad de las Americas-Puebla

John R. Nuckols, co-Editor
Colorado State University

Rene Reyes, co-Editor
Universidad de las Americas-Puebla ®

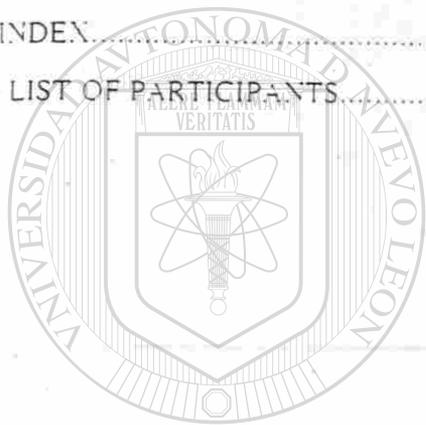
Mary Ward, co-Editor
U. S. National Cancer Institute

ISBN Number 1-887201-17-3

U.S. Library of Congress Catalog Card No.: 98-061876

Copyright © 2000 Revised Edition by Water Resources Publications, LLC. All rights reserved. Printed and bound in the United States of America. No part of this publication may be reproduced, copied, transmitted, transcribed or stored in any form or by any means such as mechanical, electronic, magnetic, optical, chemical, manual or otherwise, without prior written permission by the publisher, Water Resources Publications, LLC 7200 E. Dry Creek Rd., Suite E-104, Englewood, Colorado 80112, USA.

SIMULATION OF ATMOSPHERIC CONTAMINATION IN THE CITY OF PUEBLA CAUSED BY VEHICULAR EMISSIONS D. Randolph, W. Switek and J.A. Minutti.....	407
SLUDGE TREATMENT AND DISPOSAL ALTERNATIVES Alberto Lopez-Lopez.....	419
PHASECULUS VULGARIS L. VAR. PINTO AMERICANO AS BIOLOGICAL INDICATOR OF THE SITES CONTAMINATED WITH LEAD AND CADMIUM Alicia Marcela Ita-Garay.....	425
CHROMATE RESISTANCE AND REDUCTION IN A YEAST STRAIN ISOLATED FROM INDUSTRIAL WASTE DISCHARGES. R. Ramirez-Ramirez, C. Calvo-Mendez, M. Avila-Rodriguez and J.F. Gutierrez-Corona.....	437
COMMUNITY BEHAVIOR ABOUT SOLID WASTE IN A RESIDENTIAL ZONE IN MEXICO Sara Ojeda Benitez, F. Fernando Gonzalez Navarro, and Ma. Elizabeth Ramirez Barreto.....	447
AUTHOR INDEX.....	457
ISEEHS AS LIST OF PARTICIPANTS.....	459



UAN

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECA

Phaseolus vulgaris L. var. PINTO
AMERICANO INDICATOR OF SITES
CONTAMINATED WITH LEAD AND
CADMIUM

Ada Marcela Ita Garay *, Ma. Adriana Nuñez,
Maiti Rafikanta y Jorge L. Hernández Piñero

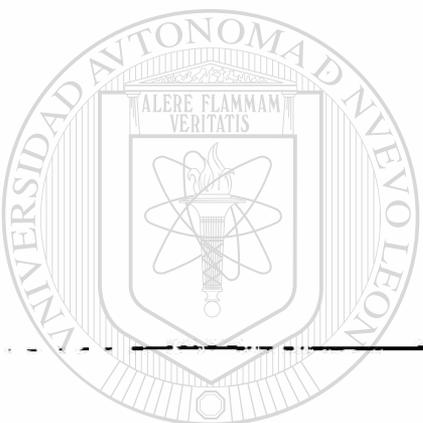
Instituto de Ciencias Biológicas,
Universidad Autónoma de Nuevo León,
A.P. 16 San Nicolás de los Garza,
Nuevo León, México. T. 66450
adaita@uasnl

ABSTRACT

The use of treated residual water in agricultural irrigation is promoted in areas with little availability of water. However, the presence of heavy metals in it impedes its use. The present study evaluated the tolerance of *Phaseolus vulgaris* L. var. pinto americano to different concentrations of Lead and Cadmium. Include the maximum permissible limits (LMP) for the NOM-001-ECOL-1996. (Diario Oficial de la Federación). The determination of elements was carried out with the technique of Plasma Emission Spectroscopy. The development of the seedlings was seriously affected by the higher concentrations of Cd, accumulating until 74 ppm in the root as well as in the aerial part. In the latter case the lower quantity of nutrients were detected compared to that in the roots. On the contrary, the treatments with lead favored the development of the plant and presented a higher quantity of nutrients both in the root as well as in the aerial part in a proportional manner to the concentration given of the metal. The Pb accumulated mainly in the root, reaching to concentrations of 120 ppm. The species resulted to be more tolerant to the lead to that of the cadmium, for which could be utilized as an geobotanic indicator in the case of the cadmium and/ or as an biogeochemical indicator for lead.

1. INTRODUCTION

Today the river water which is used in agricultural irrigation counts with the sufficient discharge of treated with residual water contains considerable amount of inorganic substances to the toxic level: Arsenic,



Barium, Cadmium, Cinnames, Chromium, Mercury, Nitrites, Lead, Radioactivity and Selenium. Lead is present in higher percentage in the organic matter (41.2%) and the cadmium the lower one(21%). The time of retention of the heavy metals vary considerably, however the lead is one of the heavy metal which shows greater retention time. It is estimated as half the time of retention of 5,000 years upto 150 years. (Shaw 1990)

The level of heavy metals in the plants has been increased even five times that from the industrialization, since the vegetables are the first absorb the heavy metals. The increase is more notable in those species even whose optimum growth has been observed in the soil with acidic pH.

The optimum growth of *Phaseolus vulgaris* L. var Pinto Americano is obtained in the soil with acidic pH and its cultivation is effected in the superficial horizons of the soil. The crop possesses a short cycle, which permits us to obtain the crop in a short time. It is also easy to get good germination of the seeds. We decided to evaluate the tolerance of *Phaseolus vulgaris* L. var pinto americano to different concentrations of lead. The objectives are to determine: (a) if these concentrations, including the LMP, are toxic to the species studied, (b) if they provoke a different phenological pattern (geobiotic indicator) or if *Phaseolus vulgaris* can tolerate high concentrations of these element in its tissues (biogeochemical indicator) when the species grow in a site contaminated with these heavy metals.

2. ANTECEDENTS

2.1 From where does the lead come?

The natural waters rarely contain near to 5 µg/l of heavy metals, although it is found to exceed higher value. The lead in the water supply could be of industrial origin, mines and of discharges of foundry ovens or of old pipes. Also the lead tubes or the welding of lead could dissolve lead in the water supply, this problem could aggravate when the water is acidic. It is, therefore, may be possible that the crops cultivated with the supply of the residual water may contain lead (ATSDR, 1993).

2.2 From where does the cadmium come?

The cadmium has many uses in consumption products like batteries, pigments, metal coverings and plastics. It is extracted during the production of other metals like lead, zinc, and copper, from which it is introduced into the air discharged from the industry and it could travel long distances before falling to a body of water. Cadmium has also been utilized in the elaboration of some pesticides and fertilizers. Plants and animals intake cadmium from the atmosphere, which remain in the body for long time and it could increase due to chronic exposition. (ATSDR, 1993).

2.3 Research on *Phaseolus vulgaris*

Seeds of *Phaseolus vulgaris* was germinated in lignin and Hoagland solution modified with or without Pb Cl₂ which inhibited the growth and the number of primary and lateral roots (Wozny Jercznka 1991). Plants of bean, *Phaseolus vulgaris* L. grew in nutrient solution, in presence of nitrate of lead in 10, 100, 150 Pb mg/ml which increases the chlorophyll b in the bean (Tomasevic et al. 1991). It is also observed that the concentration of heavy metals in vegetables increase year after year, for which the level of these toxic elements could not be inferred only with its content in the soil. In greenhouse experiments on bean it is observed the effect of Cd (50-125 (mM) accumulating huge quantities of Cd (particularly in root, but also in shoot and leaves (Turby and Raba, 1990).

3. OBJECTIVES

- To observe the change in phenology caused by the Lead and Cadmium in *Phaseolus vulgaris* var. pinto americano
- To indicate the distribution and accumulation of the Lead and Cadmium in the aerial part and root of the plant.
- To evaluate the interaction of the lead and cadmium with the elements of the plant in the roots and, the aerial part.
- To observe the effects of these metals on the ultra-structure of the leaf epidermis and stomata.

4. METHODOLOGY

The present work is carried out in the Laboratory of Botany in the Laboratory of Analytic Chemistry and the Electron Microscopy Unit of the Faculty of Biological Sciences of the Universidad Autonoma de Nuevo León. The biological material utilized was commercial seed of *Phaseolus vulgaris* L. pinto americano. The seeds were sown in the polyethylene pots of 355 cc (cubic centimeters) capacity with four perforations at the bottom for providing good drainage, utilizing inert white perlite which did not contribute nutrients to the medium. Five seeds were placed to a depth of five centimeters for each experimental unit. The experiment consisted of seven treatments (Control, Cd 0.4 ppm, Cd 14 ppm, Cd 21 ppm, Pb1 ppm, Pb 21 ppm and Pb 32 ppm; see Table 4.1) with five replications utilizing a completely random factorial design. The factors like light and temperature were controlled in a growth chamber (MOD BIOTRONETTE III MAR). The experiment was maintained for 30 days at 14 light hours with 30°C+ 2°C. Immediately after the sowing of each experimental units 120 ml of the corresponding concentration of Pb and Cd (pH 5.6) were applied according to the treatment, the same quantity of water was applied in the control. Three days after emergence Hoagland solution (pH 5.6) was added to each experimental unit. The lack of moisture was revised daily

and water was applied by aspersion when necessary to avoid the excessive drainage.

Table 4.1 Doses employed in the treatments

Dosis	Cd PPM	Pb PPM	Control PPM
LOW * PM	0.4	1.0	0
MEDIUM	14.05	21.60	0
HIGH	21.0	32.40	0

NOM-001-ECOL-1997 establishes the maximum permissible limits in the discharges of residual waters in waters. PM= monthly average, pondered in function of the flow of the outputs of the analysis of laboratory practiced in four compound samples and/ or simple, taken in four representative days of the discharge for a period of a month.

The determination of elements (according to AOAC, 1991) was carried out in the aerial part and in the root of the plant digesting dry matter subjected to plasm emission spectroscopy (Thermo Jarrell Ash Atom Scan TM 25) - see Fig. 4.1. The leaf surface was observed through the Scanning Electronic Microscope, LEICA MOD 5440 - see Fig 4.2.



Drying the samples in a stove
(For a week to 600C.)

Mill the samples finely (within a small plastic bag)

Put the samples in a numbered dry weight container
(Sartorius MOD. 2842)

Making ash

The samples in the container are exposed to slow fire until absence of smoke

Keep the samples for 2 hours at 500°C. (the samples should remain white) (Thermolyne 1500 Furnace)

Add to each container 5 ml of HCL 20% in order to dissolve the ash (starting from the active grade, which is 30%)

Filter with paper Whatman # 41 and subsequently wash with water.

Analyze by means of the Plasm Emission Spectrophotometer
(Thermo Jarrell Ash Atom Scan)

Fig. 4.1 Procedure employed for the detection of element, in the aerial part and root

Taking of fresh samples

Drying the samples in a stove (a week 600C)

Put the sample over aluminum base

Cover the samples with liquid carbon

Observe the changes in the leaf surface through Scanning Electronic Microscope, LEICA MOD 5440

Fig. 4.2 Procedure employed to observe the changes in the leaf surface through of Scanning Electronic Microscope, LEICA MOD 5440.

5. RESULTS

5.1 Effect on the phenology

Significant difference was observed between different concentrations of Cadmium absorbed by the plant. The dose of 32 ppm provokes a change in the phenology of this. It is important to mention that in excess of nutrient solution (daily Watering for 1 week with Hoagland Solution), has no effect on the phenology of the plant. In the case of 0.4, 12 ppm, they showed the following pattern of phenology (Fig. 5.1) which is appreciable during the second week of growth.

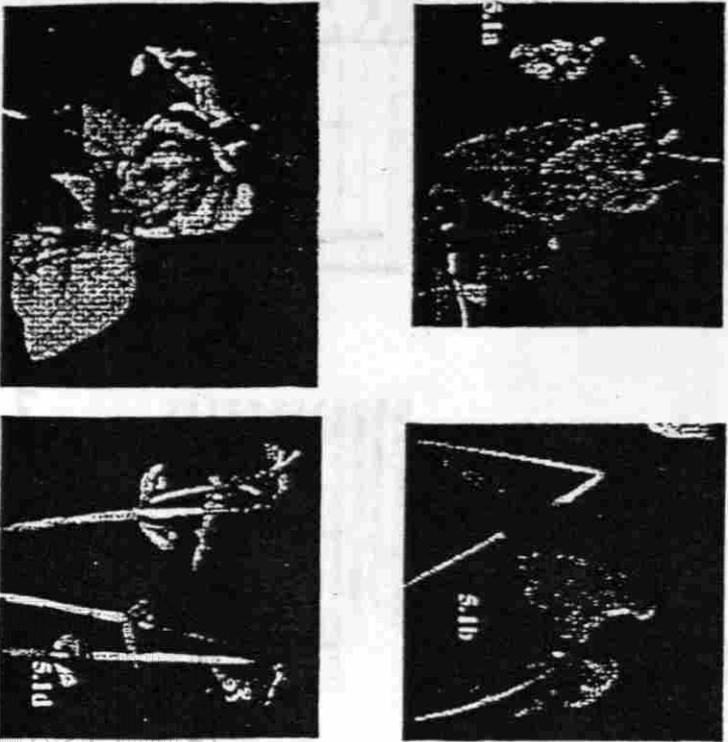


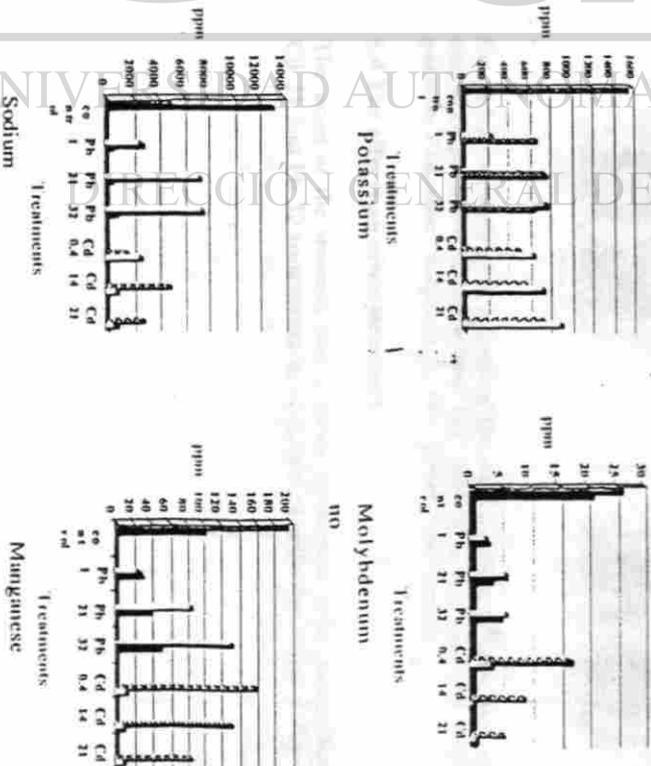
Fig.5.1 Phases observed in *Phascolus vulgaris* L. phito-americano caused by cadmium in the substrate. 5. The presence of diffuse white marks in the leaf, 5.1b Chlorosis in the leaf margins, 5.1c. Blackening of the venation, 5.1d. Complete dryness of the primary leaves, 5.1d. Wilting of the trifoliate leaf starting from the cotyledons

5.2. Effect on the absorption of nutrients

Although the absorption of different nutrients by the bean plant differed among nutrients, there was a tendency to increase in absorption with an increase in the concentration in the medium up to certain extent.

The concentration of nutrients was higher in the roots than that in the aerial part increasing with an increase in the concentration of Cd and in some cases surpassing the concentration of the control (K, Fe, Co, Cu (Fig. 5.2)). It is observed that the translocation of Mn, Mo, Fe, Co, Cu and Zn from the roots to the aerial part was affected in the aerial part (Fig.5.2), thereby reducing the growth observed in the Fig. 5.1. la. This provokes a change in the phenology as observed previously.

With respect to the treatments with lead there were increases in their concentration in the substrate with an increase in the concentration of the nutrients both in the root and in the aerial part (Fig. 5.2.1b). There was no alteration in the translocation of the nutrients, the reason for which no change was observed in the seedling height as well as in the in phenology. Only the concentration of sodium surpasses that of the control in the root.



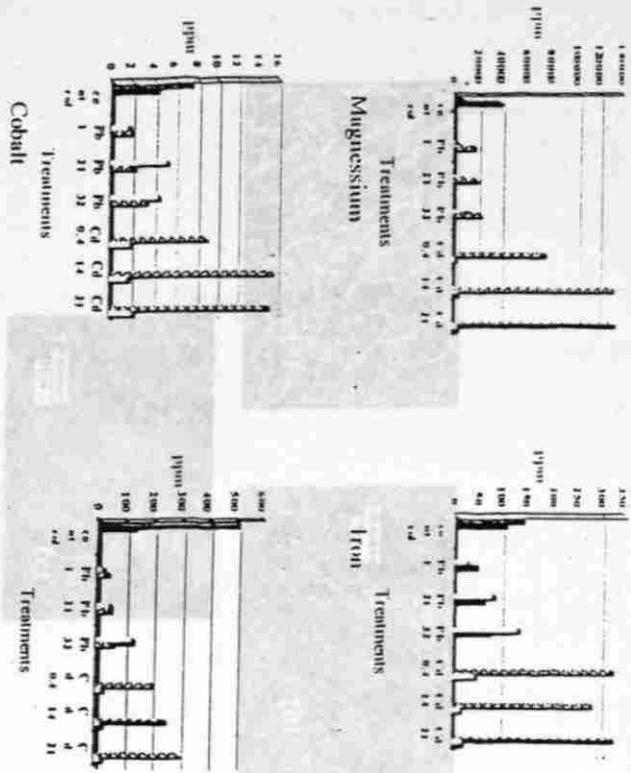


Fig. 5.2 Effect of the different Processing from Lead and Cadmium on the absorption of macro and micronutrients, analyzed by spectrophotometer of plasma transmission, Thermo Jarro Ash Atom Scan. Each graphic show the element analyzed; the first column shows ppm absorbed by the root and second ppm absorbed by the aerial part (stem and leaves). Ppm = parts by million = mg/l

5.3 Accumulation of Cadmium and Lead

Although the development of the seedling was found to be seriously affected (Fig. 5.3.a) by the very high concentrations of cadmium, accumulating up to 74 ppm in root as well as in the aerial part (Fig. 5.3c). On the contrary in the case of lead, no difference was observed in the seedling development between treatments and that of the control (Fig. 5.3b), in spite of their accumulation until 120 ppm in their root (Fig. 5.3d).

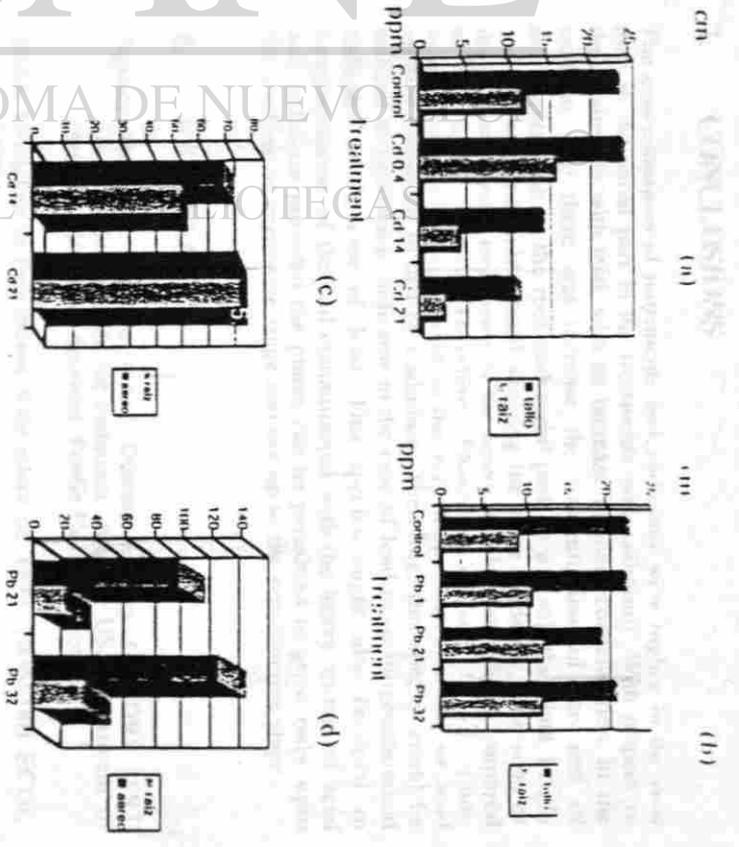
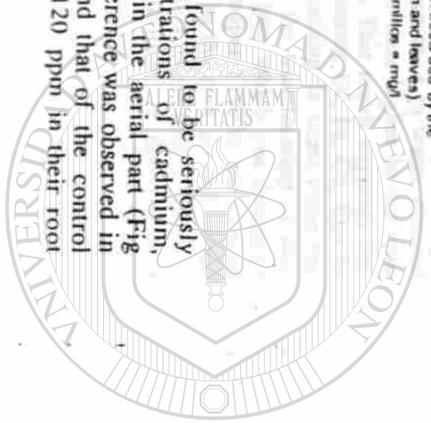


Fig. 5.3 Length to reach during the experimental phase (a) and (b), and accumulation of cadmium (c) and lead (d) in root and aerial parts in *Phaseolus vulgaris* L. var. pinto americano.

5.4 The effects on ultra-structure
The sizes of the stomata and cellular epidermal cells diminished in the Cd 21 and Pb 32 treatments in comparison with the control. Fig 5.3. (c).

7. CONCLUSIONS

The concentrations of nutrients and cadmium were higher in the root than in the aerial part in the treatments with cadmium. With respect to the treatments with lead, with an increase in their concentration in the medium also there was increase the concentration of the rest of nutrients both in the root and aerial part; as a result the plant height and dry weight also increased showing the same tendency. The sizes of the stomata under treatments of the heavy metals diminished compared to that in the control. Therefore, *Phaseolus vulgaris* L. var. pinto americana was highly tolerant to the very high concentrations of lead and cadmium compared to that of Cadmium. Therefore, this species could be utilized as geobotanic indicator in the case of lead or as biogeochemical indicator in the case of lead. This species might also be used in bioremediation of the soil contaminated with the heavy metals of lead and cadmium provided the plants can be permitted to grow only upto the seeding to vegetative stage and not up to the reproductive stage.

8. REFERENCES

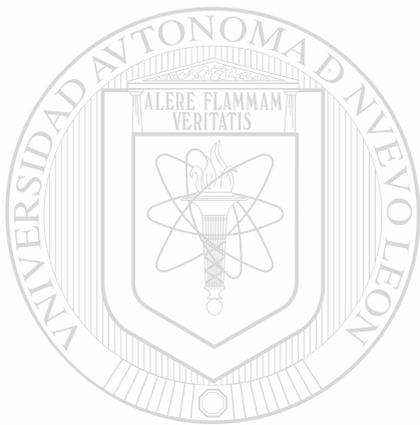
- Agency for Toxic Substances and Disease registry (ATSDR) 1993. Toxicological profile for cadmium. Atlanta: US. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Diario Oficial de la Federacion. 6 de enero de 1997. NOM-001-ECOL-1996
- Shaw J. 1990. Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects. Library of congress cataloging in Publication data. pag 11.
- Tomasevic, M., M. Bogdanovic, and D. Stojanovic. 1991. Influence of lead on some physiological characteristics of beans and barley. 93(2):337-338.
- Truby, P. and Raba. 1990. Heavy metal uptake by garden plants from Freiburg sewage farm waste water. *Agrobiological Res.* 43(2): 139-146.
- Wozny, A. and E. Jerczynska. 1991. The effect of lead on early stages of *Phaseolus vulgaris* L. growth in vitro conditions. *Biologia Plantarum*, 33(1):32-39



Fig 5.4 Control (a), Lead 32 ppm (b), Cadmium 21 (c); Magnification 1000x.

6. DISCUSSIONS

Barcelo et al. (1989) mentioned that Cd affected the water relations of the plant, thereby, diminishing its transport, but also diminished the elasticity of the cell wall, which reduced the tolerance to water stressed with heavy metal. It is confirmed that nutrients were higher in the root than in the aerial part in the treatments with Cd. This result suggests that the root absorbed maximum quantity of nutrients (K, Fe, Co, Cu) in the presence of this metal and can survive, surpassing in some cases the concentrations of the control. It is also possible the translocation of Mo, Mn, Fe, Co, Cu and Zn in the root to the aerial part which was damaged by the high quantity of Cd (14, 21 ppm). Cooper (1975) mentioned that the cadmium concentration increased both in the root as well in the shoot and leaves, being the higher in the root. In this present research it was observed that the levels of cadmium accumulated in the root and the aerial part of the bean plant were similar.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





RESPUJESTAS BIOCICAS DE PIANTIAS SLIPERICIPIRES A IIA

J.L.H.P. EXPOSITION DE ATLAS CONCERNANT LES MAIERIALES DE

ID OK753
H4 2001
c.1