



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

División de Estudios de Posgrado
Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental

Tesis:

Efecto de la asociación de hongos micorrízicos arbusculares en plantas de *Helianthus annuus* y *Tagetes erecta* para la remediación de suelos contaminados con Cromo (VI)

Que presenta

Biol. Juana Rodríguez Morales

Directora de Tesis:

Dra. Yazmín Carreón Abud

Coasesora:

Dra. María de los Ángeles Beltrán Nambo

Morelia, Michoacán, diciembre de 2018

Contenido	
Índice de cuadros	vi
Índice de figuras	vii
Lista de abreviaturas	ix
RESUMEN	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Los Metales Pesados	4
2.2. Los metales pesados en el suelo.	5
2.3 Toxicidad de los Metales Pesados	6
2.4 Toxicidad del Cromo	7
2.5 Fitorremediación	8
2.6 Plantas hiperacumuladoras	9
2.7 Contribución de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la Fitorremediación.	12
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS:	16
5. OBJETIVO GENERAL	16
5.1 Objetivos Particulares:	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS	17
6.1 Experimento A	17
6.1.1 Desinfección de semilla	17
6.1.2 Diseño experimental de germinación de semillas	17
6.1.3 Caracterización del suelo.	18
6.1. 4 Siembra de plántulas <i>H. annuus</i>.	19
6.1.5 Inóculación de HMA.	19
6.1.6 Diseño Experimental.	20
6.1.7 Determinación de las variables vegetativas de <i>H. annuus</i> (girasol).	20
6.1.8 Determinación del porcentaje de colonización de los HMA utilizados.	21
6. 1.9 Análisis estadístico.	22
6.2 Experimento B	22

6.2.1 Desinfección de semillas de <i>T. erecta</i> (cempasúchil).....	22
6.2.2 Germinación de semillas de <i>T. erecta</i> (cempasúchil).....	22
6.2.3 Trasplante e inoculación con HMA.	22
6.2.4 Diseño experimental.	23
6.2.5 Determinación de las variables vegetativas de <i>T. erecta</i>	24
6.2.6 Determinación del porcentaje de colonización de los HMA utilizados.	25
6.3 Experimento C.....	25
6.3.1 Análisis de absorción de Cromo por las plantas.....	25
6.3.2 Procesamiento, análisis y registro de valores.....	25
6.3.3 Cálculo de las relaciones de concentración.	26
6.4 Análisis estadístico.	28
7. RESULTADOS.....	28
7.1 RESULTADOS DEL EXPERIMENTO A: <i>Helianthus annuus</i> (Girasol) crecidas en suelo suplementado con Cr a 150, 200 y 300 mg/kg.....	28
7.1.1 Prueba “ <i>in vitro</i> ” de germinación de tres variedades de girasol y uniformidad de talla.	28
7.1.2 Prueba de Germinación en “sustrato” de semillas de <i>H. annuus</i> (girasol) y uniformidad de la talla.....	29
7.1.3 Caracterización del suelo.	30
7.1.4 Porcentajes de sobrevivencia de <i>H. annuus</i> (Girasol).....	31
7.1.5 Colonización micorrízica en las raíces de plantas <i>H. annuus</i>	31
7.1.6 Altura de las plantas de <i>H. annuus</i> (girasol) crecidas a diferentes concentraciones de Cr (VI).....	32
7.2 RESULTADOS DEL EXPERIMENTO B: <i>Tagetes erecta</i> L. suplementada con 48.5, 91.7 y 194.2 mg/kg de Cr (VI).	36
7.2.1 Porcentaje de sobrevivencia en plantas de <i>T. erecta</i> (cempasúchil) expuestas a diferentes concentraciones de Cr (VI).	36
7.2.2 Colonización micorrízica en las raíces de raíz de las plantas de <i>T. erecta</i> (cempasúchil).	36
7.2.3 Altura y peso de plantas de <i>T. erecta</i> (cempasúchil) crecidas en cuatro diferentes concentraciones de Cr (VI).	39

7.2.5 Número de hojas y botones de <i>T. erecta</i> (cempasúchil) a cuatro diferentes concentraciones de Cr (VI).....	44
7.2.6 Determinación de área foliar mediante el análisis de imágenes digitales con el software winRIZHO.....	45
7.3 Análisis de absorción de Cr (VI) por las plantas <i>H. annuus</i> (girasol) y <i>T. erecta</i> (cempasúchil).....	46
7.3.1 Factor de bioconcentración y traslocación de metales pesados en las plantas.....	49
8. DISCUSIÓN.....	51
8.1 Experimento A (girasol).....	51
8.2 Experimento B (cempasúchil).....	55
8.3 Experimento C (cempasúchil).....	57
10. LITERATURA CITADA.....	60

Índice de cuadros

Cuadro 1. Análisis realizados en el laboratorio de edafología de la UMSNH. En base a la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de la fertilidad salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.....	19
Cuadro 2. Diseño experimental <i>H. annuus</i> experimento A.....	20
Cuadro 3. Diseño experimental <i>T. erecta</i> experimento B.....	23
Cuadro 4. Análisis de la germinación y uniformidad de talla en tres variedades de girasol, prueba “ <i>in vitro</i> ”	28
Cuadro 5. Evaluación de germinación y uniformidad de talla de semillas de girasol variedad “Gigante”.....	29
Cuadro 6. Evaluación de germinación y uniformidad de talla de girasol silvestre, sembrados en sustrato (peat moss, perlita y vermiculita), a los 15 días.	29
Cuadro 7. Resultados de análisis realizados en el laboratorio de edafología de la UMSNH. En base a la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de la fertilidad salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Ar=% Arena, L=% Limo, Ac=% Arcilla, *Para suelos francos, SI=sin interpretación en la NOM-021-RECNAT-2000, **Valores promedio de partículas.	30
Cuadro 8. Porcentaje de sobrevivencia en plantas de <i>H. annuus</i> . Se analizaron 16 tratamientos, con y sin inoculación con HMA y cuatro diferentes concentraciones de Cr (VI).	31
Cuadro 9. Porcentaje de sobrevivencia en plantas <i>T. erecta</i> a las 12 semanas de crecimiento. Se analizaron 16 tratamientos, con y sin inoculación con HMA y cuatro concentraciones diferentes de Cr (VI).....	36

Índice de figuras

Figura 1. Plantas con 4 semanas de crecimiento en macetas de con suelo sin presencia de Cr (VI)	24
Figura 2. Porcentaje de colonización de HMA en raíces de <i>H. annuus</i> (girasol) con Cr (0 y 150 mg/kg) y tres inóculos: <i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ($P = 0.05$, χ^2).....	32
Figura 3. Altura promedio de las plantas <i>H. annuus</i> , con Cr (0, 150 y 200 mg/kg) y tres inóculos: <i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ($P = 0.05$, χ^2).....	33
Figura 4. Longitud de la raíz de <i>H. annuus</i> , con Cr (0, 150 y 200 mg/kg) y tres inóculos: <i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ($P = 0.05$, χ^2).....	34
Figura 5. Peso fresco de la parte aérea de plantas de <i>H. annuus</i> sin Cr y con Cr (48.5, 97.1 y 194.2 mg/kg) y tres inóculos: <i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P = 0.05$, χ^2).....	35
Figura 6. Peso seco de la parte aérea de <i>H. annuus</i> , con Cr (0, 150 y 200 mg/kg) y tres inóculos: <i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ($P = 0.05$, χ^2).....	35
Figura 7. Porcentaje de colonización de raíces de <i>T. erecta</i> inoculadas con <i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y un consorcio-Cr en raíces de plantas de <i>T. erecta</i> expuestas a diferentes concentraciones de Cr (VI). Letras diferentes indican diferencia significativa ($P = 0.05$, Tukey).....	37
Figura 8. Imágenes de raíces colonizadas de <i>T. erecta</i> con <i>R. intraradices</i> (A), consorcio-Cr (B) y <i>G. gigantea</i> (C) expuestas a concentraciones de Cr (VI). Flechas negras muestran estructuras fúngicas (hifas, vesículas, micelio externo, coils y arbusculos).....	38
Figura 9. Altura promedio de las plantas <i>T. erecta</i> , con Cr (0, 48.5, 97.1 y 194.2 mg/kg) sin HMA y con los inóculos: <i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P = 0.05$, Tukey).	39
Figura 10. Peso fresco de la parte aérea de plantas de <i>T. erecta</i> , sin Cr y con Cr (48.5, 97.1 y 194.2 mg/kg) y tres inóculos: <i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P = 0.05$, Tukey).	40
Figura 11. Peso seco de la parte aérea de plantas de <i>T. erecta</i> , sin Cr y con Cr (48.5, 97.1 y 194.2 mg/kg) y tres inóculos: <i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P = 0.05$, Tukey).	41
Figura 12. Longitud de la raíz de <i>T. erecta</i> , con Cr (0, 48.5, 97.1 y 194.2 mg/kg) y los inóculos: <i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P = 0.05$, Tukey).	42

Figura 13. Peso fresco de la raíz de <i>T. erecta</i> , con Cr (0, 48.5, 97.1 y 194.2 mg/kg) y los inóculos: <i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa (P = 0.05, Tukey).	43
Figura 14. Peso seco de la raíz de <i>T. erecta</i> , con Cr (0, 48.5, 97.1 y 194.2 mg/kg) y los inóculos: <i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos (P = 0.05, Tukey).	43
Figura 15. a) Número de hojas y b) botones de <i>T. erecta</i> , con Cr (0, 48.5, 97.1 y 194.2 mg/kg) y los inóculos: <i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa (P = 0.05, Tukey).	44
Figura 16. Área foliar de las plantas <i>T. erecta</i> inoculadas con <i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y Consorcio-Cr expuestas a diferentes concentraciones de Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa (P = 0.05, Tukey).	45
Figura 17 . Concentración de Cr en las raíces inoculadas (<i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y Consorcio-Cr) y no inoculadas de las plantas <i>T. erecta</i> (cemplasuchlit). Letras diferentes indican diferencias significativas (P≤ 0.05, Tukey).	46
Figura 18. Concentración de Cr en las partes aéreas de las plantas <i>T. erecta</i> (cempasuchil) inoculadas (<i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y Consorcio-Cr) y no inoculadas. Letras diferentes significan diferencias significativas por la prueba Tukey P≤ 0.05	47
Figura 19. Concentración de Cr total en las plantas <i>T. erecta</i> (cempasuchil) inoculadas (<i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y Consorcio-Cr) y no inoculadas. Letras diferentes indican diferencias significativas (P≤ 0.05, Tukey).	48
Figura 20. Factor de translocación de la raíz a la parte aérea de las plantas <i>T. erecta</i> (cempasuchil) expuestas a las diferentes concentraciones de Cr (VI) e inoculadas (<i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y Consorcio-Cr) y no inoculadas. Letras diferentes indican diferencias significativas (P≤ 0.05, Tukey).	49
Figura 21. Factor de bioconcentración parte aérea de las plantas <i>T. erecta</i> (cempasuchil) crecidas en suelo con diferentes concentraciones de Cr (VI), e inoculadas (<i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y Consorcio-Cr) y no inoculadas. Letras diferentes indican diferencias significativas (P≤ 0.05, Tukey).	50
Figura 22. Factor de bioconcentración de la raíz de las plantas <i>T. erecta</i> (cempasuchil) expuestas a las diferentes concentraciones de Cr (VI) e inoculadas (<i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y Consorcio-Cr) y no inoculadas. Letras diferentes indican diferencias significativas (P≤ 0.05, Tukey).	50
Figura 23. Concentración de Cr en el suelo en donde se crecieron plantas <i>T. erecta</i> (cempasuchil) bajo a las diferentes concentraciones de Cr (VI) e inoculadas (<i>R. intraradices</i> , <i>G. gigantea</i> y Consorcio-Cr) y no inoculadas. Letras diferentes indican diferencias significativas (P≤ 0.05, Tukey).	51

Lista de abreviaturas

Cr	Cromo
HMA	Hongos micorrízicos arbusculares
Cr (III)	Cromo trivalente
Cr (VI)	Cromo hexavalente
CrO ₄	Cromatos
Cu	Cobre
Zn	Zinc
Cd	Cadmio
Pb	Plomo
As	Arsénico
AP	Altura de la planta
LR	Longitud radical
PFA	Peso fresco aéreo
PFR	Peso fresco radical
PSA	Peso seco aéreo
PSR	Peso seco radical

RESUMEN

La contaminación por metales pesados (MP) es producto de las actividades antropogénicas modernas, debido al uso intensivo de combustibles fósiles y recursos minerales no renovables en diferentes procedimientos contemporáneos del desarrollo industrial y agrícola. Aunque muchos de los MP son componentes esenciales de las funciones metabólicas de las plantas y se requiere de su biodisponibilidad dentro de los rangos de concentración apropiados, el exceso de estos elementos en el medio ambiente tiene el potencial de inducir un desequilibrio en la disponibilidad de nutrientes. Para contrarrestar esta contaminación varias investigaciones se han enfocado en las plantas y microorganismos que pueden absorber o inmovilizar muchos de estos MP. A esta tecnología se le denomina fitorremediación y surge como una nueva alternativa para la limpieza de ambientes contaminados. El uso de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en combinación con plantas, es un enfoque alternativo para mejorar la eficacia de la fitorremediación. La simbiosis micorrízica, considerada por algunos autores como hongos que viven en las raíces de las plantas, es una asociación mutualista entre los hongos del suelo y las raíces de las plantas vasculares que desempeñan un papel fundamental en la limitación y la translocación de los MP a los tejidos de éstas, mitigando así los efectos de su toxicidad en las plantas. En particular, el Cromo (Cr) es un metal altamente tóxico para los microorganismos y para las plantas, que debido a su frecuente uso industrial es un contaminante del suelo y de otros ecosistemas. Para contrarrestar el efecto de este metal en el medio ambiente se utilizan plantas hipercuamuladoras y acumuladoras de MP como *Helianthus annuus* L. (girasol), y *Tagetes erecta* L. (Cempasúchil), ambas en colonización con HMA, ya que esta asociación potencializa la capacidad bioacumuladora de las plantas frente a Cr. El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto sinérgico de *H. annuus* L. y *T. erecta* L. en asociación con tres inóculos de HMA (*R. intraradices*, *G. giganteae* y Consorcio-Cr) en un suelo contaminado con Cr (VI), bajo un gradiente de concentración de cromato de potasio (K_2CrO_4), en un rango de 48 a 192.4 mg / kg de suelo. Las variables evaluadas en las plantas fueron: porcentajes de sobrevivencia, colonización micorrízica, altura, longitud radical, biomasa (peso fresco y seco aéreo/radical) y la cantidad de Cr absorbido. Entre los principales resultados se reporta que la mayoría de las plantas de Girasol utilizadas no sobrevivieron hasta el final del experimento

debido a que las concentraciones de Cr establecidas resultaron altamente tóxicas, sin embargo, se pudo observar el efecto positivo de *R. intraradices* para contrarrestar la toxicidad del Cr ya que incrementó la altura de las plantas (superior a 60 cm). Para las plantas de *T. erecta* los resultados muestran que el aumento de la concentración de Cr afectó el crecimiento de las plantas, observando una disminución en la sobrevivencia, con porcentajes finales de 26.46, 23.93, 20.38, 9.01 % en los tratamientos control, *R. intraradices*, *G. gigantea* y consorcio-Cr respectivamente, con la concentración más alta en el suelo (194.2 mg/kg). Los inóculos de HMA lograron que el efecto del Cr en la planta fuera menor ya que incrementaron de manera significativa el tamaño de estas con respecto al tratamiento control. En general, este mismo comportamiento se observó en el peso fresco y seco de la raíz y parte aérea. La longitud de la raíz fue mayor en plantas inoculadas con respecto a las no inoculadas, y su longitud mayor fue de 35 cm en los tratamientos contaminados con 194.2 mg/k de Cr. La colonización de las raíces de *T. erecta* por el Consorcio-Cr muestra un porcentaje bajo con un 5%, el más alto lo presentó *G. gigantea* con aproximadamente 60 % de colonización en las plantas sin Cr y en la concentración 194.2 mg/kg. La mayor acumulación de Cr lo presentaron las plantas en combinación con los HMA, principalmente *G. gigantea* con 133 mg/kg seguido de consorcio-Cr con 109 mg/kg a Cr 194.2 mg/kg. Los tejidos de la raíz acumularon mayor cantidad de Cr cuando se encontraron inoculadas con los HMA (más de 60 mg /kg en la concentración más alta), mientras que la planta por si sola trasloca la mayor cantidad acumulada de Cr a la parte aérea (factor mayor a 1.2). De igual manera, el factor de translocación es mayor a 1 en estos tratamientos, por lo que *T. erecta* puede ser considerada una planta acumuladora de Cr. De manera general, concluimos que los HMA proporcionaron protección a las dos especies vegetales estudiadas ante la presencia de Cr, mostrando un efecto positivo en el crecimiento y acumulación de Cr en las raíces de *T. erecta*, evitando su translocación a la parte aérea. Sin embargo, se evidencia que este efecto positivo varía dependiendo de la especie de planta y del socio fúngico involucrado.

Palabras clave: Fitorremediación, Cromo (VI), *Helianthus annuus*, *Tagetes erecta*, HMA,

1. INTRODUCCIÓN

El suelo contaminado con metales pesados (MP) es un problema que ha ido en aumento principalmente por actividades antropogénicas (Khalid *et al.*, 2017). Entre las principales causas de contaminación se encuentran el uso intensivo de combustibles fósiles y recursos minerales no renovables, a través de distintos procedimientos del desarrollo industrial y agrícola (Alkorta *et al.*, 2004, Wuana y Okieimen, 2011, Carreón-Abud *et al.*, 2016). De la minería y la manufactura industrial deriva el consumo de combustibles y durante este proceso existe la producción concomitante de aguas residuales industriales y la utilización de materiales contaminantes. Del mismo modo, en la agricultura, la introducción de contaminantes que contienen metales en los agroecosistemas, por lo general se deriva de la aplicación de pesticidas químicos, aditivos de granja, fertilizantes y su persistencia en suelos agrícolas. Tras su liberación al ambiente, los MP persisten en los ecosistemas en función de su constitución química y biodisponibilidad relativa (Audet, 2014).

Uno de los MP que es un importante contaminante del suelo es el Cromo (Cr), por su amplio uso en la industria, en aleaciones, incluyendo la fabricación de acero, en curtido de pieles, en la producción de pigmentos, pinturas y galvanoplastia (Nath *et al.*, 2005). Dichas actividades han incrementado los niveles de este metal en el ambiente, lo que representa un peligro potencial para los organismos vivos. El cromo se presenta principalmente en dos estados de oxidación, el Cr (III) (trivalente) y el Cr (VI) (hexavalente), de los cuales el último es el más tóxico. El Cr (VI) usualmente se encuentra en iones cromato CrO_4^{2-} o dicromato $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (Borst-Pauwels, 1981), los cuales atraviesan fácilmente las membranas biológicas y puede ser transportado activamente al interior de las células por medio del transportador de sulfato (Borst-Pauwels, 1981), por lo que puede resultar nocivo para plantas, animales y microorganismos que habitan en el suelo, además puede afectar a los seres humanos debido a sus efectos carcinogénicos tóxicos y potentes (Madhavi *et al.*, 2013).

Debido a lo anterior existe la necesidad de reducir los niveles de contaminación de este metal. Para enfrentar la contaminación por Cr VI, se han empleado numerosos métodos físico-químicos convencionales utilizados para remover MP de los suelos. Pero estas tecnologías han

presentado como principales desventaja costos elevados y que la mayor parte de los métodos empleados utilizan sustancias que no son deseables para el ambiente (Zou *et al.*, 2013)

Considerando estas limitaciones, se han buscado alternativas de solución sobre los procesos convencionales para la recuperación de suelos contaminados. Varias investigaciones se han enfocado en las plantas y microorganismos que pueden absorber o inmovilizar muchos tipos de contaminantes, incluidos metales, o transformar el metal, lo cual puede reducir su biodisponibilidad (Rajendran *et al.*, 2003) denominando a esta tecnología como fitorremediación; que surge como una nueva alternativa para la limpieza del medio ambiente (Barceló y Poschenrieder, 2003). Entre las ventajas que muestra esta técnica en comparación con las llamadas convencionales, se encuentra su bajo costo, la aplicabilidad en grandes áreas y un menor impacto hacia el ambiente (Robinson, *et al.*, 1997).

La fitorremediación es un enfoque multidisciplinario que combina la fisiología de las plantas, la química del suelo y la microbiología del suelo (Yang *et al.*, 2016). Existen varias formas de fitorremediación, entre ellas la fitoextracción es la más importante; se refiere a los procesos que utilizan plantas para concentrar los metales del suelo en las raíces y los brotes de la planta. Las plantas que se consideran ideales para la fitorremediación son identificadas como “hiperacumuladoras”, las cuales tienen una tasa de crecimiento rápido, mayor biomasa y son capaces de tolerar y acumular altas concentraciones de metales pesados (Brooks *et al.*, 1977, Baker, 1981 y Ahemad, *et al.*, 2015).

El uso de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en combinación con plantas, es un enfoque alternativo para mejorar la eficacia de la fitorremediación. Los HMA pueden limitar la translocación de los MP, mitigando los efectos de su toxicidad (Corradi y Charest, 2011). Se ha reportado que en algunos casos las plantas micorrizadas pueden mostrar mayor captación de MP por la raíz y aumentar el transporte de estos a la parte aérea de la planta (Rabie, 2005), mientras que en otros casos el uso de HMA contribuye a la inmovilización del metal en las raíces de las plantas o en el suelo (González-Chávez *et al.*, 2004). Esta asociación mutualista entre los hongos del suelo y las raíces de las plantas vasculares representa una compleja dinámica constituida por una diversidad de interacciones que desempeñan un papel fundamental en la nutrición de las

plantas y la estabilización del suelo a través de una variedad de condiciones del medio (Koide, 1991, 1993), incluyendo las deficiencias de metales y/o de nutrientes (Leyval *et al.*, 1997; Göhre y Pazkowski de 2006). Esta relación es considerada como simbiosis micorrízica (Boucher *et al.*, 1982; Leung y Poulin, 2008). Existen numerosos ejemplos exitosos de esta combinación utilizada para absorber MP, proponiendo a los HMA como componentes beneficiosos en el funcionamiento y la recuperación de los ecosistemas afectados con metales (Joner *et al.*, 2000; Ortiz- Cano *et al.*, 2009, Alvarado *et al.*, 2011, Audet, 2014; Rajkumar *et al.*, 2012)

Basados en lo anterior, se eligieron dos plantas consideradas acumuladoras, *Helianthus annuus* L. y *Tagetes erecta* L., para este estudio, debido a su buen crecimiento y alta biomasa en los suelos de campo contaminados por Cr (VI). Investigamos las respuestas de estas plantas a diferentes gradientes de concentración de Cr (VI) en el suelo y asociadas a diferentes HMA, para observar los cambios en la producción de biomasa y la acumulación de dicho metal en la planta, en presencia de estos hongos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Los Metales Pesados

Los metales constituyen uno de los mayores grupos de contaminantes tóxicos para el ambiente. En contraste a los contaminantes orgánicos, que en muchos casos pueden ser degradados, los metales liberados en el ambiente tienden a persistir indefinidamente, acumulándose en los tejidos vivos a través de la cadena trófica (Grubor, 2008), ya que son las únicas sustancias que no pueden ser degradadas biológica ni químicamente y solo pueden ser modificadas o transformadas de un estado de oxidación a otro o de un complejo orgánico a otro (Abollino *et al.*, 2002; Bolán *et al.*, 2014). Como consecuencia de la alteración de los estados de oxidación, pueden transformarse en sustancias más solubles en agua que pueden eliminarse por lixiviación; otros se convierten a formas menos solubles, lo que conduce a su precipitación haciéndose menos disponibles; y otros pueden transformarse en sustancias menos tóxicas volátiles que pueden ser removidas del área contaminada (Garbisu y Alkorta, 1997).

Los metales pesados (MP) son definidos como elementos con propiedades metálicas como ductibilidad, conductividad, densidad, estabilidad como catión y especificidad a ligando (Garbisu *et al.*, 2003), número atómico mayor de 20, y cuya densidad es mayor a los 5 g cm³. Se consideran MP el plomo (Pb), mercurio (Hg), cadmio (Cd), arsénico (As), cromo (Cr), talio (Tl), entre otros (Lucho *et al.*, 2005).

Los MP se encuentran generalmente como componentes naturales de la corteza terrestre, en forma de minerales, sales u otros compuestos (Abollino *et al.*, 2002); algunos de ellos son requeridos como micronutrientes para las plantas (Van Assche *et al.*, 1990). Son esenciales para algunos procesos ya que ejercen funciones catalíticas en determinadas reacciones bioquímicas o en conversiones metabólicas. Actúan como micronutrientes o cofactores enzimáticos, pueden estabilizar estructuras proteicas, facilitar el transporte de nutrientes, así como la neutralización y control de la presión osmótica (Rajendran *et al.*, 2003).

Sin embargo, a cierto umbral ejercen un marcado efecto citotóxico, por lo que el mantenimiento de las concentraciones adecuadas es un factor importante para lograr el equilibrio

de los organismos y su ambiente (Marrero *et al.*, 2010). Es el caso del boro (B), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), molibdeno (Mo), manganeso (Mn), níquel (Ni), hierro (Fe), selenio (Se) y zinc (Zn). Los metales pesados, sin función biológica conocida, que resultan altamente tóxicos y presentan la propiedad de acumularse en los organismos vivos son: arsénico (As), cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (Pb), antimonio (Sb), bismuto (Bi), estaño (Sn) y talio (Tl) (García y Dorronsoro, 2005).

2.2. Los metales pesados en el suelo.

Las altas concentraciones de MP que están presentes en los suelos pueden ser por causas naturales y antropogénicas. Entre las causas naturales se encuentran la actividad volcánica, procesos de formación de suelos, meteoros, erosión de rocas, terremotos, tsunamis, entre otras. Las causas antrópicas son por procesos como la minería, fundición de metales, galvanoplastia, la combustión de carburantes fósiles, la industria a través de los vertidos, emisiones (incineración, depósito), residuos provenientes de algunos pesticidas y fertilizantes, etc., (Garbisu *et al.*, 2003; Pineda, 2004; Volke *et al.*, 2005). Así mismo, las formas geoquímicas de los metales en los suelos afectan su solubilidad, lo cual se relaciona directamente con su biodisponibilidad; el destino de los MP en el suelo depende principalmente de la forma química del metal, pero también de las condiciones ambientales y edáficas como el pH, potencial redox y contenido de materia orgánica (Rajendran *et al.*, 2003).

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) afecta la biodisponibilidad del metal y depende del contenido de materia orgánica y arcillas del suelo; la toxicidad de los metales en suelos con alta CIC es baja, mientras que en suelos con baja CIC la toxicidad aumenta (Roane *et al.*, 2000).

El pH es un factor esencial, la mayoría de los metales tiende a estar más disponibles en un pH ácido debido a formas iónicas libres, excepto As, Mo, Se y Cr, los cuales tienden a estar más disponibles a pH alcalino. En medios con pH básicos moderadamente alto se produce la precipitación como hidróxidos y la biodisponibilidad disminuye debido a la formación de minerales de fosfatos y carbonatos insolubles (Rajendran *et al.*, 2003). En medios muy alcalinos, pueden nuevamente pasar a la solución como hidroxicomplejos. Por esta razón la adsorción de los

MP está fuertemente condicionada por el pH del suelo y por tanto, también la biodisponibilidad de sus compuestos (Alloway, 1995).

La materia orgánica puede adsorber tan fuertemente a algunos metales, como es el Cu, que pueden quedar en forma no disponible por las plantas. La textura favorece la entrada e infiltración de la contaminación de MP en el suelo. Por ejemplo, la arcilla tiende a adsorber a los metales pesados, que quedan retenidos en sus posiciones de cambio, por el contrario, los suelos arenosos carecen de capacidad de fijación de los metales pesados, los cuales pasan rápidamente al subsuelo y pueden contaminar los niveles freáticos (Pineda, 2004).

En general, los MP incorporados al suelo pueden seguir cuatro diferentes vías: la primera, quedar retenidos en el suelo, ya sea disueltos en la fase acuosa del suelo u ocupando sitios de intercambio; segunda, específicamente adsorbidos sobre constituyentes inorgánicos del suelo; tercera, asociados con la materia orgánica del suelo y cuarta, precipitados como sólidos puros o mixtos. Por otra parte, pueden ser absorbidos por las plantas y así incorporarse a las cadenas tróficas; pueden pasar a la atmósfera por volatilización y pueden ser movilizados a las aguas superficiales o subterráneas (García y Dorronsoro, 2005).

Para elucidar el comportamiento de los MP en los suelos y prevenir riesgos tóxicos potenciales, se requiere la evaluación de la disponibilidad y movilidad de los mismos (Banat *et al.*, 2005). La toxicidad de los metales depende no sólo de su concentración, sino también de su movilidad y reactividad con otros componentes del ecosistema (Abollino *et al.*, 2002).

2.3 Toxicidad de los Metales Pesados

La entrada de MP al suelo permite que ingresen a la cadena alimenticia, pero esto depende de la cantidad y origen del metal, las propiedades del suelo, la tasa y magnitud de toma por parte de las plantas y la absorción por parte de animales (Bolan *et al.*, 2014). Para que los metales puedan ejercer su toxicidad, estos deben encontrarse disponibles para ser captados por los seres vivos, es decir biodisponibles (Soto *et al.*, 2010).

Las actividades industriales generan la movilización de MP y producen serias repercusiones en el ecosistema, de esta manera altas concentraciones de los MP pueden generar afectaciones serias en la salud de los humanos y otras formas de vida como animales y plantas (Duffus, 2002). Es conocido que las altas concentraciones de MP pueden afectar la microbiota de ecosistemas directamente a través de la modificación del tamaño de la población, la diversidad y la actividad (Rajapaksha *et al.*, 2004). Cambios en el perfil de elementos traza del suelo producen alteraciones fisiológicas y genéticas en varias formas de vida como plantas, fauna acuática, insectos, anélidos, aves y mamíferos (Rajendran *et al.*, 2003).

2.4 Toxicidad del Cromo

El Cr es usado como Cr (III) y Cr (VI) en la industria de las curtiembres y en la industria maderera, este metal es altamente tóxico y carcinógeno cuando está presente a bajas concentraciones en el agua (Bolán *et al.*, 2004). El Cr (III) es estable y se encuentra principalmente unido a materia orgánica del suelo o de ambientes acuáticos, por lo que tiene una menor movilidad. Las características de los dos estados iónicos del Cr hacen que los efectos nocivos, causados por dicho metal, sean casi en su totalidad, consecuencia de la exposición al Cr (VI). Pese a que el cromo es un elemento esencial para animales, altas concentraciones del metal resultan tóxicos. El cromo (VI) en las plantas, provoca clorosis generalizada, semejante a la deficiencia de hierro (Hewitt, 1953). Además, disminuye la síntesis de clorofila y en consecuencia afecta la fijación del CO₂ y el metabolismo de carbohidratos (0.01-1 mg Cr (VI) l-1).

De acuerdo a Golovatyj *et al.* (1999) la mayor concentración del Cr se encuentra en las raíces y es menor en las estructuras aéreas vegetativas y reproductivas. La razón de la alta acumulación del Cr en las raíces es porque éste es inmovilizado en las vacuolas de las células de las raíces, haciéndolo menos tóxico. Desde que el Cr (VI) y el Cr (III) cruzan la endodermis vía simplasto, el Cr (VI), en las células se reduce a Cr (III), el cual es retenido en las células del córtex bajando las concentraciones de Cr (VI), lo que en parte podría explicar la baja toxicidad de Cr (III). Las enzimas que reducen el Cr (VI) han sido reportadas ampliamente en bacterias y hongos (Cervantes *et al.* 2001).

2.5 Fitorremediación

Los avances tecnológicos para sanear ambientes contaminados por metales tóxicos han conducido al desarrollo de alternativas que se basan en el empleo de organismos vivos para prevenir o restaurar daños provocados por acciones antropogénicas que alteran la estabilidad de los diferentes ecosistemas. En este sentido resalta la biorremediación, técnica basada en la existencia de microorganismos con capacidad de atacar enzimáticamente los compuestos. Las estrategias pueden ser empleadas *in situ* y *ex situ* dependiendo del lugar en donde serán aplicadas, *in situ* es un tratamiento que se realiza en el sitio de la contaminación y *ex situ* se da cuando se remueve el suelo o el agua con el subsecuente tratamiento (Saadoun y Al-Ghzawi, 2005).

La fitorremediación es una de las vertientes de la biorremediación que puede considerarse una tecnología alternativa rentable y sostenible (Robinson, 2006). En ella se emplean plantas (flora arbórea, arbustiva, herbácea) (Rahami et al., 2010) y algas (Kirk, 1996) que tienen la capacidad de almacenar y eliminar sustancias tóxicas mediante sus procesos metabólicos, principalmente MP, por lo que son denominadas plantas hiperacumuladoras. Existen varias técnicas de fitorremediación aplicables a suelos contaminados con metales pesados: fitoextracción, fitoestabilización, fitodegradación, fitovolatilización, fitorrestauración.

La fitoextracción, también conocida como fitoacumulación, consiste en la absorción y translocación de los metales desde las raíces hasta las partes aéreas de las plantas; estas posteriormente se cortan y se incineran o son acumuladas con el objetivo de reciclar los metales.

La fitoestabilización se basa en el uso de plantas tolerantes a los metales para inmovilizarlos a través de su absorción y acumulación en las raíces o precipitación en la rizosfera, con lo cual disminuye su movilidad y biodisponibilidad para otras plantas o microorganismos en suelos donde la gran cantidad de contaminantes imposibilita la fitoextracción (Epelde, 2009).

La fitodegradación y rizodegradación se refieren a la degradación de contaminantes orgánicos a través de las enzimas de las plantas, sus productos o por la acción de microorganismos rizosféricos; la fitorrestauración está referida a la reforestación de áreas contaminadas con especies

resistentes de rápido crecimiento, que previenen la migración de partículas contaminantes y la erosión de los suelos (Rahami *et al.*, 2010; Leigh, 2006).

Las plantas realizan la captura de elementos tóxicos mediante diversos mecanismos. Esto ocurre a través de transportadores altamente específicos presentes en sus raíces con una gran capacidad para absorber distintos contaminantes (Llugany, 2003).

2.6 Plantas hiperacumuladoras

No todas las plantas son apropiadas para la fitorremediación. Las plantas ideales para este propósito deben tener varias características, entre las que se incluyen un crecimiento rápido, una alta producción de biomasa y la habilidad para acumular cantidades significativas de metales en la parte aérea (Tariq y Ashraf, 2016), así como tolerancia a altas concentraciones de MP en el medio de crecimiento. Esta notable excepción existe en un pequeño grupo de plantas que pueden tolerar, absorber y translocar altos niveles de ciertos metales, estas plantas reciben el nombre de hiperacumuladoras (Chen *et al.*, 2001).

El término fue acuñado por Brooks y colaboradores (1977) para referirse a plantas desarrolladas en campo capaces de acumular $>1.000 \text{ mg Ni kg}^{-1}$ de materia seca en algún tejido de su biomasa aérea (Brooks *et al.*, 1977). De forma general, las hiperacumuladoras alcanzan concentraciones de metales en hojas entre 10 y 100 veces las concentraciones “normales” (Chaney *et al.*, 2000). La capacidad de las plantas para bioacumular metales y otros posibles contaminantes varía según la especie vegetal y la naturaleza de los contaminantes.

La diferencia en la absorción de metales, pueden ser atribuidas precisamente a la capacidad de retención del metal en cuestión, por el suelo de cultivo, a la interacción planta-raíz-metal y al metabolismo vegetal propio (Vig *et al.*, 2003). Actualmente se utiliza el término hiperacumuladora de metales para designar plantas que acumulan $>10.000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Mn y Zn, $>1.000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Co, Cu, Pb, Ni, As y Se y $>100 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cd y Cr. Otra definición propone que si una planta contiene más de 0.1% de Ni, Co, Cu, Cr y Pb ó 1% de Zn en sus hojas sobre una base del peso

seco, puede ser llamada "hiperacumuladora", independientemente de la concentración del metal en el suelo (Robinson *et al.*, 2003).

La absorción de MP por las plantas es generalmente el primer paso para la entrada a la cadena alimenticia. La absorción y posterior acumulación dependen de la movilidad de los metales desde la solución en el suelo a la raíz de la planta y después a la parte aérea. También existen plantas que pueden hiperacumular diversos elementos contaminantes, no sólo uno (Brooks, 1998).

Más de 400 especies de plantas hiperacumuladoras, pertenecientes a 45 familias, han sido identificadas globalmente. Sin embargo, las plantas que pueden acumular y tolerar Cr son menos numerosas. Las plantas hiperacumuladoras de Cr pueden acumular > 1000 mg/kg Cr, en sus tejidos (Redondo-Gomez *et al.*, 2011). Algunas plantas identificadas hiperacumuladoras de Cr incluyen *Spartina argentinensis* (Redondo-Gomez *et al.*, 2011), *Dyera costulata* (Ghafoori *et al.*, 2011), *Pluchea indica* (Sampanpanish *et al.*, 2006), *Amaranthus dubius* (Mellem *et al.*, 2012), *Convolvulus arvensis* (Gardea-Torresdey *et al.*, 2004), *Prosopis laevigata* (Buendía-Gonzalez *et al.*, 2010), *Pteris vittata* (de Oliveira *et al.*, 2016) y *Leersia hexandra* (Liu *et al.*, 2011).

Además de acumular altos niveles de metales, las especies de plantas hiperacumuladoras transforman el Cr a formas menos tóxicas e inmóviles (Cervantes *et al.*, 2001). Las plantas hiperacumuladoras pueden tolerar Cr a través de la quelación, biotransformación con reductantes, ligandos de alta afinidad y con la compartimentación en la vacuola o el citoplasma. Varios estudios informaron que la reducción de Cr (VI) a Cr (III) y la inmovilización / compartimentación en vacuolas de las células de la raíz representan un mecanismo de desintoxicación de Cr por las plantas (Pulford *et al.*, 2001).

La hiperacumulación de Cr y otros MP por las plantas depende de numerosos factores, tales como (i) mayor movilización de metales en el suelo de la rizosfera (ii) aumento de la absorción y translocación para disparar tejidos a través de una mayor carga de xilema, y (iii) quelación y desintoxicación de metales dentro de las células vegetales (Shahid *et al.*, 2014a). Se informa que las plantas hiperacumuladoras mejoran la movilidad y biodisponibilidad del metal al secretar ácidos orgánicos, que forman complejos solubles con metales en el suelo (Shahid *et al.*, 2012e). Estos están generalmente formando complejos con ligandos orgánicos, seguido de su secuestro en

vacuolas (Shahid *et al.*, 2014e). Los ligandos incluyen aminoácidos, ácidos orgánicos, péptidos y polipéptidos.

Entre las plantas comúnmente utilizadas para la extracción de metales se encuentra la planta *H. annuus* (girasol) una planta que crece de manera silvestre, puede llegar a medir hasta 2.5 m, se ambienta con facilidad a cualquier tipo de clima, llega a resistir temperaturas altas y sequias, la semilla de *H. annuus* se utiliza para la producción de aceite. Esta especie absorbe metales pesados en grandes cantidades por lo que se considera una planta hiperacumuladora para Cd, Zn, Pb y elementos radiactivos (Christie *et al.*, 2004; Reeves, 2003; Davies *et al.*, 2002). También se ha reportado como hiperacumuladora para Cr (III) y Cr (VI) (De la Rosa *et al.*, 2008; Davies *et al.*, 2002), además de As, Bi, Cu, Mn, Sb y Ti (Boonyapookana *et al.*, 2006; Christie *et al.*, 2004).

Otra de las plantas que se ha empleado para la fitorremediación es *T. erecta* (cempasúchil) se encuentran entre las plantas ornamentales, medicinales e industriales comerciales más importantes. Estas plantas se utilizan comúnmente como plantas de flores ornamentales en el paisajismo. Además, tienen varios beneficios medicinales, por ejemplo, se usa en el tratamiento de parásitos gastrointestinales. Existe un estudio que concluye que *T. erecta* cultivada y en asociación con HMA en un suelo contaminado con Cr (VI) puede crecer y acumular concentraciones considerables de Cr (VI) principalmente en las raíces de la planta (Karthik *et al.*, 2016).

Por otro lado, el 80% de las plantas vasculares, incluidas las que crecen en sitios impactados por MP, están colonizadas por HMA, formando una asociación mutualista. Los HMA pueden promover la restauración ecológica de estos sitios, a través de varios mecanismos, como incrementar la absorción de minerales y la tolerancia y acumulación de las plantas, ya que muestra efectos positivos significativos como mayor supervivencia de la planta, crecimiento, nutrición, así como mejor estructura y calidad del suelo, ayudando a mantener la estabilidad y el funcionamiento del ecosistema. (Gaur y Adholeya, 2004).

2.7 Contribución de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la Fitorremediación.

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son simbioses obligados del 70-90% de las plantas terrestres (Harrison, 1999). Los HMA desempeñan funciones importantes en el suelo. Algunos autores los consideran parte integral de las raíces de las plantas por su función para la mayor adquisición de nutrientes como fósforo (P) y nitrógeno (N) y algunos micronutrientes. De igual manera, participan en la modificación del ambiente rizosférico (área de influencia de las raíces en el suelo), mejoran la estructura del suelo, disminuyen las condiciones de estrés (salinidad, sequía, acidez, etc.) e incrementan la tolerancia a enfermedades de la raíz (Singh *et al.*, 2013).

En condiciones de altas concentraciones de MP en el suelo, se ha observado que los HMA colonizan en forma natural las raíces de plantas que crecen en estos sitios contaminados (Ortega-Larrocea *et al.*, 2010), jugando un papel importante en la resistencia de las plantas a la contaminación por MP (Wu *et al.*, 2010) como As, Cd, Cu, Zn, Pb y Cr. González-Chavez *et al.* (2009) mostraron evidencias de que los HMA pueden estar involucrados en la atenuación natural de ambientes contaminados.

Entre los principales mecanismos de acción de los HMA se encuentran: la restricción en la absorción de metales pesados y si estos son absorbidos, pueden acumularlos en su biomasa (esporas, micelio, pared) en donde ocurre un secuestro intracelular y compartimentalización, otro mecanismo es la secreción de quelantes y evitar o disminuir la cantidad que ingresa a la célula vegetal (Göhre y Paszkowski, 2006). En el caso de la restricción en el ingreso de MP, el micelio externo (o extrarradical) y la glomalina son capaces de inmovilizar los MP, actuando a nivel de pared celular fúngica.

El micelio que se encuentra fuera de la raíz explora una mayor área del suelo, la glomalina es una glicoproteína a nivel de superficie que las hifas de los HMA producen abundantemente durante su crecimiento activo (Gonzalez-Chavez *et al.*, 2004). Por tanto, ambas estructuras fúngicas reducen la disponibilidad y así disminuyen la toxicidad de estos contaminantes en el sistema suelo-planta (Joner *et al.*, 2000).

El secuestro intracelular ocurre a nivel de citoplasma por formación de complejos de los iones metálicos por medio de aminoácidos, fitoquelationas o metalotioneinas (Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2007 y Shine *et al.*, 2015). También se observa compartimentalización, principalmente en las vacuolas (González- Guerrero *et al.*, 2008); así, se disminuye la forma iónica de los MP y su toxicidad.

En suelos contaminados con MP, al estar micorrizadas, las plantas adquieren mayor tolerancia y capacidad para sobrevivir la condición de estrés abiótico (González-Chavez *et al.*, 2009, 2011, 2013b). Cornejo *et al.* (2013), encontró que esporas de HMA acumulan Al y Cu en suelos con elevado contenido de MP.

Cuellar *et al.* (2011) observaron significativamente menor producción de micelio externo al incrementar la concentración de Cd (1 mg/L adicionado en la solución nutritiva), Pb (20 mg/L) y Zn (40 mg/ L). Sin embargo, a estas altas concentraciones de los elementos la capacidad del micelio para secuestrar estos MP aún fue significativa (20 g de Cd por g micelio seco, 60 g de Pb g y 25 g de Zn g).

González-Chávez *et al.*, (2004) mostraron que la glomalina secuestra Pb, Cd, Cu, Zn, Mn, entre otros MP presentes en suelos contaminados. Ésta disminuye el riesgo de MP en su forma iónica y, por tanto, su toxicidad. Aunado al carácter recalcitrante de la glomalina y su abundante producción, el secuestro de MP puede considerarse un proceso irreversible a largo plazo.

La presencia de los HMA en suelos contaminados con metales pesados puede contribuir significativamente a mitigar y disminuir la contaminación de éstos, sin embargo, la contaminación de el/los metales continúan en el sitio y para eliminarlos de una forma más eficiente, es necesario investigar en conjunto otras estrategias, como la utilización de plantas hiperacumuladoras de metales pesados que sean capaces de extraer el/los metales a la parte aérea o raíz. De esta manera, los HMA evitarían el paso de los contaminantes a las cadenas tróficas mientras la planta extrae el contaminante del suelo.

En este sentido se han realizado investigaciones tendientes a resolver el problema de la contaminación de suelos contaminados con algún MP. Davies *et al.*, (2001) encontró que *Glomus*

intraradices, enriqueció la capacidad de las plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.) para tolerar Cr (VI) y absorbe mayor cantidad de metal en sus raíces que en sus brotes.

Por otro lado, Lin *et al.*, (2003) examinaron los efectos de diferentes concentraciones de CuSO₄ sobre el crecimiento y la acumulación de Cu²⁺ en raíces, hipocótilo, cotiledón y hojas de *H. annuus*. Las concentraciones usadas de CuSO₄ dentro el intervalo 10⁻⁵ a 10⁻³ M. Las plántulas expuestas a solución de Cu²⁺ 10⁻⁵ M con un aumento del 33% en crecimiento (P < 0,005) en comparación con la longitud de raíz del testigo. Las plántulas tratadas con 10⁻³ M Cu²⁺ fueron inhibidas en la formación de los brotes (P <0.005). Las raíces de las plantas expuestas a 10⁻³ M Cu²⁺ acumulado mayor cantidad de Cu, y el Cu²⁺ nivel fue aproximadamente 25 veces superior a la de control. Con lo que concluyeron que *H. annuus* tiene capacidad potencial para acumular Cu.

Así mismo Pineda (2004), estudio la contribución de HMA, *Glomus intraradices*, en la absorción y translocación de Zn y Cu en *H. annuus* (girasol) crecida en un suelo contaminado con residuos de mina. Se muestrearon suelos de cuatro sitios, en un gradiente de 74 km de longitud, escogiendo el que tiene presencia de HMA nativos. Propagados para su identificación. Se cuantificó la concentración de Zn y Cu raíz y parte aérea. Encontró una diferencia significativa entre los tratamientos, los HMA aumentaron absorción de Cu en la raíz y redujo el paso a la parte aérea.

Simona *et al.*, (2006) determinaron la presencia Cd, Cu, Pb y Zn en el crecimiento de *H. annuus* (girasol) y en la expresión total de proteínas foliares. Se evaluaron la altura, la producción en masa y la distribución del metal en la planta (raíces, tallos y hojas) absorbió 4 iones metálicos lo que disminuye la altura y la masa en un 35% y 40%, respectivamente, en comparación con el control. Los tratamientos que absorbieron Zn y la solución de iones mixtos mostraron cierto grado de estrés oxidativo. Concluyeron que *H. annuus* es una especie que tiene la capacidad de acumular altas concentraciones de uranio y cadmio en sus tejidos (principalmente tallo y raíz) con una razonable tolerancia.

Wu *et al.*, (2014) demostraron con su investigación el papel positivo de HMA en la tolerancia al Cr por las plantas diente de león (*Taraxacum platyepidum* D.) y bermuda común (*Cynodon dactylon* L.).

De igual manera, se ha informado que *T. erecta* comúnmente llamada cempasúchil es una planta que acumula metales pesados en sus tejidos y además forma asociaciones simbióticas con HMA, que aumentan la capacidad de estas plantas para tolerar la fitotoxicidad de los MP. Se observó que las asociaciones simbióticas con hongos micorrízicos aumenta el crecimiento de *T. erecta* y la acumulación de Cu en ambientes con alta concentración de Cu (Castillo *et al.*, 2011).

Coelho *et al.*, (2017) investigaron el potencial de *T. erecta* en la fitorremediación de Cr. Sin embargo, depende de una variedad de factores tales como las características del suelo, la naturaleza de los metales pesados, los HMA y las plantas para comprender el comportamiento. Sin embargo, una mejor comprensión de la interacción entre HMA y las plantas será clave para mejorar la eficacia de la fitorremediación.

3. JUSTIFICACIÓN

La importancia de este estudio se sustenta en los problemas de contaminación de suelo con Cr (VI) que existen actualmente, debido principalmente al uso de este metal en las industrias de curtiduría y textil. Para resolver el problema se requiere de métodos de tratamiento menos costosos y eficientes de descontaminación de metales pesados que sean amigables con el ambiente. Tal es el caso de la fitorremediación. La capacidad de algunas plantas “hiperacumuladoras” para absorber, metabolizar, acumular, estabilizar o volatilizar contaminantes orgánicos y/o inorgánicos como los metales pesados, puede potencializarse en combinación con hongos micorrízicos arbusculares. Sin embargo, se requiere más información sobre las interacciones planta-microorganismos de la rizósfera, y sobre los efectos de estas interacciones en la acumulación de MP al interior de las plantas, así como del papel que juegan los HMA en el proceso de fitorremediación. En la medida en que este conocimiento se incremente, será posible una aplicación más eficiente de esta tecnología.

4. HIPÓTESIS:

La asociación de los HMA con plantas meta-tolerantes *Helianthus annuus* L. y *Tagetes erecta* L. tiene la capacidad de potenciar la absorción y acumulación de Cr en los tejidos vegetales.

5. OBJETIVO GENERAL.

Analizar el efecto de los HMA en el desarrollo y acumulación de Cr en *Helianthus annuus* L. y *Tagetes erecta* L. crecidas en un suelo contaminado con diferentes concentraciones de Cr.

5.1 Objetivos Particulares:

- A. Determinar el efecto de la infectividad de los HMA en la protección de las plantas *H. annuus*, crecidas en suelos contaminados con diferentes concentraciones de Cr.
- B. Evaluar la respuesta de la inoculación de HMA en la protección y crecimiento de *T. erecta* en suelos contaminados con diferentes concentraciones de Cr.
- C. Cuantificar la cantidad de Cr que absorben *H. annuus* y *T. erecta* inoculadas con HMA.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo fue dividido en dos experimentos:

Experimento A: para este experimento se utilizaron plantas *H. annuus* y tres inóculos de HMA: *Rhizophagus intraradices*, *Gigaspora gigantea* y un Consorcio-Cr, crecidas en suelo suplementado con Cr (VI) a concentraciones de 150, 200 y 300 mg/kg de suelo.

Experimento B: Se empleó a *T. erecta* (cempasúchil) y tres inóculos de HMA: *Rhizophagus intraradices*, *Gigaspora gigantea* y un Consorcio-Cr, crecidas en suelo suplementado con Cr (VI) a concentraciones de 48.5, 97.1, 194.2 mg/kg de suelo.

6.1 Experimento A

6.1.1 Desinfección de semilla

Se seleccionaron semillas de girasol de tres variedades (enana, gigante y otoño) de peso similar, viables y sin daño aparente y se sometieron a una desinfección superficial por inmersión en alcohol al 95% (v/v) por 5 minutos y posteriormente con cloro comercial (Cloralex) al 20% por 7 minutos, finalizando con 5 enjuagues en agua tridestilada estéril (Talukdar y Germina, 1994; Zhu *et al.*, 2000).

6.1.2 Diseño experimental de germinación de semillas

Una vez esterilizadas, un lote de las semillas de *H. annuus* (girasol) se colocaron en 5 cajas Petri con medio de cultivo MS 0.2x (Murashige y Skoog 1962), suplementado con 1% de sacarosa y 1% de agar. Se colocaron 3 semillas en cada caja, dando un total de 15 semillas por cada una de las tres variedades de girasol. Se incubaron en una cámara de crecimiento (Percival AR95L), a una temperatura de 25 °C y 16 horas luz, hasta el rompimiento de testa y formación primera raíz.

Un segundo lote de semillas se colocó en charolas de germinación con sustrato de Peatmoss, perlita y vermiculita, en una proporción 1:1:1 esterilizado previamente. Se colocaron 20 semillas en cada una, para un total de 240 semillas puestas a germinar. Las semillas se mantuvieron húmedas con agua estéril, en condiciones semicontroladas de invernadero durante 15 días.

Se realizaron observaciones diarias y se registró el tiempo y porcentaje de germinación en cada uno de los tratamientos. Después de la germinación las plántulas que mostraban más vigorosidad y presentaron un tamaño aproximado a 2 cm se utilizaron para el trasplante.

6.1.3 Caracterización del suelo.

Para este proyecto se utilizó un suelo que fue colectado de la capa arable del suelo proviene de la localidad de Tiripetío del Municipio de Morelia, Michoacán de Ocampo; debido a que es un suelo representativo del centro del país. La localidad se encuentra localizado en las coordenadas geográficas 19°32'48"N 101°20'54"O 19.54667, -101.3483 y tiene una altitud de 2 020 metros sobre el nivel del mar.

Los parámetros especificados en la tabla 1, se determinaron en el Laboratorio de Edafología de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana.

Cuadro 1. Análisis realizados en el laboratorio de edafología de la UMSNH. En base a la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de la fertilidad salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.

Cuadro 1. Análisis realizados en el laboratorio de edafología de la UMSNH. En base a la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de la fertilidad salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis

PARÁMETRO	MÉTODO
ANÁLISIS FÍSICO	
TEXTURA DEL SUELO	DE BOUYOUCOS
DENSIDAD APARENTE	VOLUMÉTRICO
DENSIDAD REAL	PICNÓMETRO
HUMEDAD DEL SUELO	GRAVIMÉTRICO
ANÁLISIS QUÍMICO	
MATERIA ORGÁNICA	DE OXIDACIÓN CON ÁCIDO CRÓMICO Y ÁCIDO SULFÚRICO
pH	POTENCIOMÉTRICO
CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO TOTAL (CICT)	VOLUMÉTRICO DEL VERSENATO

6.1. 4 Siembra de plántulas *H. annuus*.

Se seleccionaron las plántulas con características semejantes en tamaño, color, diámetro del tallo y se trasplantaron a macetas con capacidad de 1 kg, cada maceta contenía suelo estéril colectado de una parcela de maíz, se trasplantaron un total de 80 plantas para el establecimiento de un diseño experimental de 4 tratamientos con cuatro niveles cada uno. Las plantas fueron semicontroladas en condiciones de invernadero y se regaron a capacidad de campo.

6.1.5 Inóculación de HMA.

La inoculación se realizó al momento del trasplante, aplicando 10 % de inóculo del total de sustrato puesto en cada maceta, el cual consistió en una mezcla de suelo y sistemas radicales (conteniendo raíces colonizadas, esporas y micelio externo), en cada uno de los tratamientos (González-Chávez *et al.*, 1998). Los inóculos que se utilizaron fueron: *Rhizophagus intraradices*, *Gigaspora gigantea* y un consorcio-Cr. Para la inoculación de HMA se realizó previamente una cuantificación del número de esporas presentes en 50g de suelo inoculado, por el método de tamizado en húmedo y decantación de Gerdemann y Nicholson (1963). De manera que los 100 gr de inóculo por maceta contenían un promedio de 70 esporas. Además de un tratamiento sin adición de inóculo como control.

6.1.6 Diseño Experimental.

El experimento se desarrolló bajo condiciones de invernadero con una temperatura que fluctuó entre 25 a 30 °C durante el día. Las plántulas de *H. annuus* con 15 días de germinación se sacaron de las cajas de germinación, y fueron colocadas en las macetas de experimentación. Bajo un diseño completamente al azar. Posteriormente se colocó el inóculo de 100 g de los tres inóculos de HMA (cuadro 2). A las tres semanas de trasplante se realizó riego a capacidad de campo con una solución de dicromato de potasio a diferentes concentraciones: 0, 150, 200, 300 mg/kg.

Cuadro 2. Diseño experimental *H. annuus* experimento A.

Inóculos	Concentración de Cr en mg/kg				Repeticiones
Control	0	150	200	300	5 x4=20
<i>R. intraradices</i>	0	150	200	300	5 x4=20
<i>G. gigantea</i>	0	150	200	300	5 x4=20
Consortio Cr	0	150	200	300	5 x4=20

6.1.7 Determinación de las variables vegetativas de *H. annuus* (girasol).

Se evaluaron variables de la planta cada semana, hasta su cosecha a las 12 semanas de crecimiento. Se evaluó supervivencia, floración y las variables: altura de la planta (AP), longitud radical (LR) y biomasa: peso fresco y seco aéreo/radical (PFA/PFR) (PSA/PSR). Después de la cosecha las raíces se lavaron con agua corriente, con mucho cuidado para evitar desprenderlas de la planta, y quitando en la medida posible todos los residuos de suelo. Posteriormente se midió con ayuda de una regla AP, LR y para PFA/PFR y PSA/PSR de cada planta se utilizó una balanza analítica separando parte aérea y raíz. Para el peso seco las plantas cosechadas se colocaron en estufa de secado a una temperatura de 60° durante 72 horas, después de lo cual se registró su peso. La supervivencia se determinó en porcentaje de plantas vivas al final del experimento, del total de réplicas para cada tratamiento. Para la floración se registraron el número de botones y flores por repetición.

6.1.8 Determinación del porcentaje de colonización de los HMA utilizados.

Se registró el porcentaje de colonización observando estructuras como hifas, arbuscúlos y vesículas. Las raíces después de la cosecha, fueron separadas de la parte aérea y lavadas para eliminar cualquier exceso de suelo adherido. Se usó la técnica de Phillips & Hayman (1970), la cual emplea la tinción del colorante azul de tripano, y cuyo procedimiento, con ligeras modificaciones, consiste en lo siguiente: se limpiaron las raíces con agua corriente y un enjuague final con agua destilada, se colocaron en tubos de ensaye, cubriéndolos con una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10%, posteriormente se calentaron a baño maría a 65⁰C, durante 10 minutos.

Pasados los 10 minutos se decantó el KOH y se lavaron con agua para eliminar el resto de la solución. Consecutivamente las raíces se cubrieron con ácido clorhídrico (HCl) al 10% durante 3 a 4 minutos a temperatura ambiente. Este tratamiento tiene como función neutralizar los residuos de KOH. Se eliminó la solución sin enjuagar. Y se tiñeron con azul de tripano al 0.05% en lactoglicerol, calentando durante 10 minutos a una temperatura de 65°C en Baño María. Se retiró el colorante sin enjuagar.

Finalmente se adicionó lactoglicerol limpio y se guardaron en tubos Falcón para su conservación y posterior montaje. Para observar la colonización, se tomaron las muestras de las raíces teñidas y se colocaron en cajas Petri; en un portaobjetos y con pinzas, se colocaron 20 segmentos de aproximadamente 1 cm de longitud, de la raíz teñida, en forma paralela y se colocó un cubreobjetos. Se montaron dos laminillas por muestra. Se determinó el porcentaje de colonización mediante la técnica de McGonigle *et al.* (1990). Para realizar la evaluación se observó al microscopio, donde se efectuaron pasajes semejantes a cada una de las laminillas. A partir de 100 intersecciones, al revisar un campo óptico donde se encontraba un segmento que contenía hifas, vesículas, arbuscúlos, micelio externo, independientemente de la intensidad de micorrización se le dio el valor de 1 para un total de 100 observaciones. El porcentaje de colonización se determinó por cantidad de observaciones colonizadas con respecto al total.

6. 1.9 Análisis estadístico.

Los datos se analizarán utilizando el análisis de ji cuadrada con nivel de significancia ($p < 0,05$) de los tratamientos. Se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 23. Se utilizó este análisis por que las muestras no tenían una distribución normal, de tal forma que se corrieron los para datos no paramétricos.

6.2 Experimento B.

6.2.1 Desinfección de semillas de *T. erecta* (cempasúchil).

Las semillas usadas fueron de la marca comercial “Rancho Los Molinos” S.A de C.V., México.

Las semillas fueron desinfectadas superficialmente antes de su germinación por agitación en alcohol al 95% (v/v) por 5 minutos y posteriormente con cloro comercial (Cloralex) al 10% por 5 minutos, finalizando con 5 enjuagues en agua tridestilada estéril.

6.2.2 Germinación de semillas de *T. erecta* (cempasúchil).

Las semillas fueron germinadas en un sustrato de perlita, peat-moss y vermiculita en relación 1:1:1, ya que se observó que este sustrato permitía una buena germinación. La mezcla del sustrato fue esterilizada dos veces en autoclave a 120 °C durante 30 min, antes de ser empleada en las cajas de plástico para germinación. Las cajas donde se sembraron las semillas fueron colocadas en la cámara de germinación durante 10 días a 25 °C, a riego diario, y un fotoperiodo de 16 h luz por 8 de oscuridad.

6.2.3 Trasplante e inoculación con HMA.

Previo al trasplante se preparó el sustrato (suelo colectado de parcelas de maíz del municipio de Tiripetio Michoacán), tamizado tres veces y se esterilizó dos veces en autoclave a 120 °C durante 50 min, las macetas fueron desinfectadas superficialmente con cloro comercial (cloralex). Se colocaron 2 plántulas por maceta, con 700 g de sustrato, para un total de 80 plantas, repartidas en 4 tratamientos con 4 niveles. Durante el trasplante se seleccionaron aquellas plántulas con un promedio aproximado de 3 cm de altura, características semejantes de color y número de

hojas. Posteriormente fueron colocadas en el invernadero bajo condiciones semicontroladas. Para el establecimiento de los tratamientos con HMA, la inoculación de *T. erecta* se realizó con los hongos *R. intraradices*, *G. gigantea* y un consorcio-Cr. La inoculación se realizó al momento del trasplante, aplicando 20 % de inóculo del total de sustrato de cada maceta, el cual es una mezcla de suelo con los sistemas radicales (conteniendo raíces colonizadas, esporas y micelio externo) (González-Chávez et al., 1998). Para la inoculación de HMA se realizó previamente una cuantificación del número de esporas presentes en 50 g de suelo inoculado, por el método de tamizado en húmedo y decantación de Gerdemann y Nicholson (1963). De tal forma que se adicionó un promedio de 50 esporas a cada maceta. Además, se contó con un tratamiento sin adición de inóculos como control.

6.2.4 Diseño experimental.

El experimento consistió en tres tratamientos con plantas inoculadas y uno con plantas no inoculadas, con tres concentraciones de Cr y sin Cr (VI) en el sustrato. Posteriormente se colocó el inóculo de 200 g de *Rhizophagus intraradices*, *Gigaspora gigantea* y un consorcio-Cr. A las cinco semanas de trasplante se aplicó riego con una solución de cromato de potasio (K_2CrO_4) hasta dejar a capacidad de campo, aplicando concentraciones de: 0, 48.5, 97.1 y 194.2 mg/kg. Se establecieron 6 repeticiones por tratamiento con un total de 96 unidades experimentales (cuadro 3).

Cuadro 3. Diseño experimental *T. erecta* experimento B.

Inóculos	Concentración de Cr (VI) en mg/kg				Repeticiones
Control	0	48.5	97.1	194.2	6x4=24
<i>R. intraradices</i>	0	48.5	97.1	194.2	6x4=24
<i>G. gigantea</i>	0	48.5	97.1	194.2	6x4=24
Consorcio-Cr	0	48.5	97.1	194.2	6x4=24

6.2.5 Determinación de las variables vegetativas de *T. erecta*.

Las plantas de *T. erecta* se dejaron crecer durante 12 semanas en el invernadero bajo una temperatura de 25 a 30 °C. El riego durante el crecimiento fue de cada 2 días a capacidad de campo. Semanalmente las plantas fueron fertilizadas con 60 ml de solución nutritiva Long-Asthon sin fosforo con el propósito de evitar síntomas de desnutrición en las plantas sembradas (Fig. 1).

Previo a la contaminación con las diferentes concentraciones de Cr de acuerdo a los tratamientos establecidos, a las 5 semanas de crecimiento, se realizó una cosecha de raíces con los tratamientos que contenían inóculos, para observar si las raíces presentaban colonización.



Figura 1. Plantas con 4 semanas de crecimiento en macetas de con suelo sin presencia de Cr (VI)

Durante el crecimiento de *T. erecta* se realizaron mediciones semanales de las siguientes variables: altura, número de flores, sanas o enfermas, porcentaje de sobrevivencia. Al final de experimento se determinó longitud, peso fresco y seco de parte aérea y raíz, así como área foliar.

Las plantas fueron cosechadas y limpiadas a las 12 semanas después del trasplante. Durante la cosecha las raíces se limpiaron manualmente para retirar el sustrato, se midieron la altura de la planta y longitud de la raíz, posteriormente se registró el número de hojas, brotes y tasa de sobrevivencia. Se registró el peso fresco de raíz y parte aérea por separado. Posteriormente, para determinar las masas secas de las raíces y las partes aéreas, se colocaron en bolsas de papel, se secaron en horno a 60 °C, durante 72 horas hasta peso constante.

Se determinó el área foliar mediante el análisis de imágenes digitales, del total de las hojas de cada planta, con el software winRIZHO (2013). Que se empleó como un medidor de área de color por contraste entre el color verde de las hojas y el color de fondo al digitalizar la imagen, que puede ser blanco o negro. Se transformó la imagen a blanco y negro. Posteriormente el programa mediante conteo de píxeles negros, que corresponde a las zonas de color verde en la imagen original, realizó la transformación a unidades de superficie (cm^2).

6.2.6 Determinación del porcentaje de colonización de los HMA utilizados.

La determinación del porcentaje de colonización de los HMA utilizados se realizó empleando la misma metodología de la sección 6.1.7.

6.3 Experimento C

6.3.1 Análisis de absorción de Cromo por las plantas.

6.3.2 Procesamiento, análisis y registro de valores.

Después de la cosecha, las muestras (4 por tratamiento) fueron secadas y molidos los tejidos de la parte aérea y raíz. Las muestras se pesaron y se colocaron en vasos de precipitado para realizar un proceso de digestión ácida, siguiendo la metodología USEPA SW-846 Method 3050B, con algunas modificaciones y que consistió de manera general en lo siguiente: se agregó a las muestras 10 ml de una solución 1:1 de ácido nítrico y se calentó a $40\text{ }^\circ\text{C}$ durante 5-10 min, hasta que no hubo cambio en el color, posteriormente se calentó a $95 \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min (evitando la ebullición de la mezcla) y luego 15 min en ebullición. Se dejaron enfriar. Posteriormente se les agregó 5 ml de HNO_3 concentrado y se calentó a $95\text{ }^\circ\text{C}$ en agitación durante 30 min. Este paso se repitió hasta que no hubo humos color café. Al término de este tiempo, se evaporó la solución durante aproximadamente dos horas a $95\text{ }^\circ\text{C}$. Se enfrió a temperatura ambiente y se adicionó 2 ml de agua destilada y 2 ml de solución de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 30%. Se cubrieron los vasos y se calentaron evitando que la solución hiciera efervescencia vigorosamente. Pasados 10 min se agregó 1 ml de solución de H_2O_2 al 50%. Este paso se repitió hasta que la efervescencia

desapareció. Por último, se agregó 10 ml de HCl al digestor obtenido y se colocó en reflujo a una temperatura de 95 ± 5 °C por 15 min.

Terminada la digestión las soluciones se filtraron con papel Watman® número 41 y se aforaron a 50 ml con agua destilada. Los análisis de contenido de cromo total se realizaron por espectrometría de absorción atómica de flama FLAA o IPC- AC utilizando un espectrofotómetro de gases marca Perkin Elmer 3100 usando un gas aire/acetileno a una presión de 4.3/1 kg/cm², la lámpara lee a una longitud de onda de 357.9 nm y con una energía de 65. La apertura del haz (slit) 0.7 nm (y la desviación estándar es no mayor a 5). Se registraron valores obtenidos de la concentración de Cr en la raíz, parte aérea y suelo.

A partir de la concentración de Cr en raíz, parte aérea y suelo se calcularon la captación total (es decir raíz más parte aérea), los factores de bioconcentración (FBC) y translocación (FT).

6.3.3 Cálculo de las relaciones de concentración.

Factor de bioconcentración.

Se calcula al dividir la concentración del metal en tejido seco de la planta (mg/kg) entre la concentración del elemento en el suelo (mg/kg).

El factor de bioconcentración se calculó de acuerdo propuesto por Olivares y Peña (2009) a través de las siguientes fórmulas:

$$\text{BCFRaíz} = [\text{metal}]_{\text{raíz}} / [\text{metal}]_{\text{suelo}}$$

$$\text{BCFAérea} = [\text{metal}]_{\text{aérea}} / [\text{metal}]_{\text{suelo}}$$

Donde:

BCFRaíz = Factor de bioconcentración en las raíces de la planta.

BCFAérea = Factor de bioconcentración en la parte aérea de la planta.

El factor de traslocación (TF).

Se determinó dividiendo la concentración de la parte aérea de la planta (mg/kg) entre la concentración en la raíz de la planta (Maldonado *et al.*, 2011) utilizando la siguiente relación.

$$TF = [\text{metal}] \text{ aérea}/[\text{metal}] \text{ raíz}$$

Donde:

TF = Factor de traslocación

[metal]raíz = Concentración del metal solo en la raíz de la planta en mg/Kg.

[metal]aérea = Concentración del metal solo en la parte aérea de la planta en mg/Kg.

Categorización de las plantas en función a su concentración y factores de bioconcentración y traslocación.

a. Concentración del metal en la parte aérea de la planta (Baker *et al.*, 2000).

Si Cu, Co, Cr, Ni o Pb (mg/kg) > 1000 (mg/kg) planta hiperacumuladora (Baker *et al.*, 2000).

b. Factor de bioconcentración en la parte aérea y raíz de la planta (Baker, 1981).

Si el BC_{Faérea} < 1 la planta es excluyente

Si el 1 < BC_{Faérea} < 10 la planta es acumuladora

Si el BC_{Faérea} > 10 la planta es hiperacumuladora

Si el BC_{Fraíz} < 1 la planta es excluyente

Si el 1 < BC_{Fraíz} < 10 la planta es acumuladora

Si el BC_{Fraíz} > 10 la planta es hiperacumuladora

d. Factor de traslocación.

Si el TF > 1 significa que la planta traslada eficazmente los metales pesados de la raíz a la parte aérea de la planta (Baker y Brooks, 1989), por lo que su potencial es la de hiperacumular metales en la parte aérea.

Si el $TF < 1$ significa que la planta no traslada eficazmente los metales pesados a la raíz a la parte aérea de la planta, por lo que su potencial es la de fitoestabilizar metales en sus raíces.

6. 4 Análisis estadístico.

Los datos se analizarán utilizando un análisis estadístico ANOVA de una sola vía, con la finalidad de examinar el nivel de significancia ($p < 0,05$) de los tratamientos, seguido de una prueba de Tukey. Se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 23. Las muestras que no presentaron distribución normal fueron analizadas con la prueba de Chi cuadrada (X^2).

7. RESULTADOS

7.1 RESULTADOS DEL EXPERIMENTO A: *Helianthus annuus* (Girasol) crecidas en suelo suplementado con Cr a 150, 200 y 300 mg/kg.

7.1.1 Prueba “*in vitro*” de germinación de tres variedades de girasol y uniformidad de talla.

Con base en el número de semillas sembradas (15) en caja Petri y el número total de semillas germinadas se calculó el porcentaje de germinación. En general todas las variedades de semillas probadas presentaron bajos porcentajes de germinación. Las semillas de la variedad “Gigante” fueron las que obtuvieron la mayor germinación 73%, seguido de la variedad “Otoño” con 26% y finalmente una nula germinación de la variedad enana. (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de la germinación y uniformidad de talla en tres variedades de girasol, prueba “*in vitro*”.

Variable	Gigante	Enana	Otoño
Semillas totales	15	15	15
Semillas germinadas	11	0	4

Semillas con la misma talla	5	0	3
Porcentaje de germinación	73.3%	0%	26.6%
Porcentaje de uniformidad de talla	33.3%	0%	75%

Se realizó una segunda prueba de germinación con la variedad “gigante” que fue la que reportó el mayor porcentaje de germinación. Con el objetivo de corroborar la germinación y uniformidad de talla, los datos se registraron a los 15 días. (Cuadro 5).

Cuadro 5. Evaluación de germinación y uniformidad de talla de semillas de girasol variedad “Gigante”.

Variable	Gigante
Semillas totales	60
Semillas germinadas	21
Semillas con la misma talla	6
Porcentaje de germinación	35%
Porcentaje de uniformidad de talla	10%

7.1.2 Prueba de Germinación en “sustrato” de semillas de *H. annuus* (girasol) y uniformidad de la talla.

Para las pruebas de germinación en sustrato se utilizaron semillas de girasol silvestre, debido al bajo porcentaje de germinación registrado en las variedades de semillas comerciales. Los resultados fueron comparados con las pruebas anteriores para decidir tanto la variedad de girasol como el método de germinación que se utilizaría para montar el experimento A. Los resultados de porcentaje de germinación obtenidos en esta prueba se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Evaluación de germinación y uniformidad de talla de girasol silvestre, sembrados en sustrato (peat moss, perlita y vermiculita), a los 15 días.

Variable	Girasol
Semillas totales	240
Semillas germinadas	190

Semillas con la misma talla	158
Porcentaje de germinación	79%
Porcentaje de uniformidad de talla	65%

7.1.3 Caracterización del suelo.

El análisis se llevó a cabo en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de la fertilidad salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis, excepto cuando se indica otra.

Cuadro 7. Resultados de análisis realizados en el laboratorio de edafología de la UMSNH.

En base a la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de la fertilidad salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.

Ar=% Areana, L=% Limo, Ac=% Arcilla, *Para suelos francos, SI=sin interpretación en la NOM-021-RECNAT-2000, **Valores promedio de partículas.

PARAMETRO	UNIDAD	MEDIA±DS&	INTERPRETACIÓN
pH (1:2:5)	UPH	6.62±0.07	Moderadamente ácido
Materia Orgánica	%	3.36±0.67	Media
Capacidad de Intercambio Cationico (CICT)	Cmol(+) kg ⁻¹	27.75±2.77	Alta
Textura**	Ar-L-Ac	50-20-30	Franco-Arcillo-Arenoso
Densidad Real	g/cm ³	2.29±0.22	SI
Densidad Aparente	g/cm ⁴	1.08±0.02	Común para suelos arcillosos
Porosidad*	%	47.19±5.11	Ligeramente baja

Los resultados del análisis químico del suelo mostraron un pH de 6.62 el cual es moderadamente ácido, normal para suelos de la región, densidad aparente común en suelos ricos en arcilla; la materia orgánica es media para suelos no volcánicos y combinada con su Capacidad de Intercambio Catiónico alta, hacen a este suelo fértil. Por su textura es un suelo con un buen drenaje, pero con evidencia de compactación al mostrar una porosidad ligeramente baja. En general se puede considerar de buenas condiciones de fertilidad para el desarrollo vegetal, pero con problemas de compactación que limitan el drenaje normal para suelos francos.

7.1.4 Porcentajes de sobrevivencia de *H. annuus* (Girasol).

Los porcentajes de sobrevivencia de las plantas en los diferentes tratamientos de Cr hexavalente (K_2CrO_4) se muestran en el Cuadro 8. Los cuatro tratamientos sin adición de Cr (VI) presentaron una sobrevivencia del 100%. En los tratamientos control con Cr (VI) a 150 mg/kg se registró el 100% de sobrevivencia y en la concentración de 200 mg/kg se observó un 66% de sobrevivencia, lo anterior podría ser debido a que el girasol esta reportado como una planta hiperacumuladora de metales y por lo tanto tiene resistencia a la presencia del metal sin necesidad de asociarse con hongos y sin tener que compartir recursos energéticos con el simbionte. En los tratamientos con Cr y hongos micorrízicos la sobrevivencia disminuyó observándose que en el tratamiento con *G. gigantea* sobrevivieron el 66% de las plantas a la concentración más baja de Cr, mientras que en los demás tratamientos la respuesta fue baja (20%) y a la concentración más alta las plantas no sobrevivieron en ninguno de los tratamientos. Los resultados indican que la semilla silvestre utilizada responde mejor a la presencia de Cr cuando no se encuentra en asociación con hongos micorrízicos, y que concentraciones por arriba de 150 mg/ Kg de suelo alteran los procesos fisiológicos y resultan letales para la planta.

Cuadro 8. Porcentaje de sobrevivencia en plantas de *H. annuus*. Se analizaron 16 tratamientos, con y sin inoculación con HMA y cuatro diferentes concentraciones de Cr (VI).

Tratamientos	0 mg/kg	150 mg/kg	200mg/kg	300 mg/kg
Control	100%	100%	66%	0%
<i>R. intraradices</i>	100%	20%	0%	0%
<i>G. gigantea</i>	100%	66%	0%	0%
Consorcio-Cr	100%	20%	20%	0%

7.1.5 Colonización micorrízica en las raíces de plantas *H. annuus*.

El porcentaje de colonización micorrízica en los tratamientos con *R. intrarradices*, *G. gigantea* y el consorcio-Cr, en las plantas que sobrevivieron a la exposición a Cr (VI), varió de 2% a 60% probando que los HMA conservaron su capacidad de infectividad a 150 mg/kg (Fig. 2). Los tratamientos con inóculos micorrízicos sin adición de Cr mostraron mayores porcentajes de colonización de HMA, como se esperaba. El consorcio-Cr fue el que obtuvo los mayores

porcentajes de colonización tanto en el tratamiento sin Cr (60%) así como en el tratamiento con 150 mg/kg con un 28% (Fig. 2). Los tratamientos inoculados con *R. intraradices* fueron los que obtuvieron los menores porcentajes de colonización tanto en el control como en el tratamiento adicionado con 150 mg/kg de Cr.

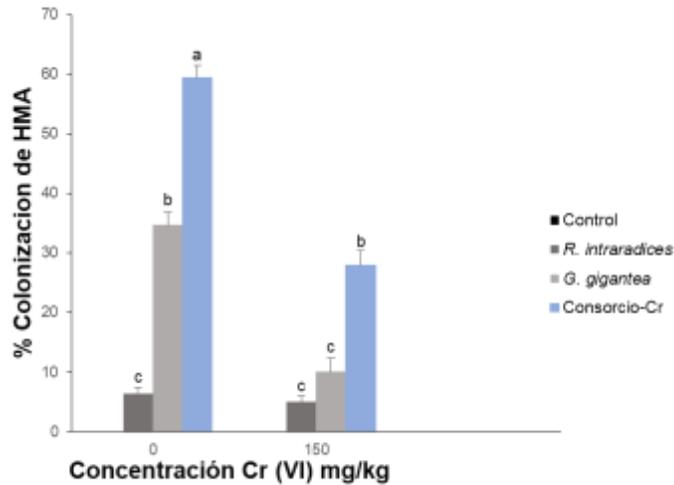


Figura 2. Porcentaje de colonización de HMA en raíces de *H. annuus* (girasol) con Cr (0 y 150 mg/kg) y tres inóculos: *R. intraradices*, *G. gigantea* y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ($P = 0.05$, χ^2 .)

7.1.6 Altura de las plantas de *H. annuus* (girasol) crecidas a diferentes concentraciones de Cr (VI).

Al final del experimento a las 11 semanas de su crecimiento se realizó la medición de altura de las plantas, observando una altura variable entre todos los tratamientos, la máxima altura fue de 79.4 cm correspondiente al tratamiento de *R. intraradices* en los tratamientos sin adición de Cr (VI) y con 150 mg/Kg de Cr, lo cual podría sugerir que aunque el porcentaje de colonización de este inóculo fue el más bajo (2 a 6 %), este porcentaje fue altamente eficiente para proveer de nutrientes a la planta, lo que se vio reflejado en la altura registrada. El tratamiento con el consorcio-Cr sin adición del metal y que fue el que obtuvo un mayor porcentaje de colonización (60%) también fue eficiente para promover altura de las plantas (72.4 cm), permitiendo además la sobrevivencia de éstas a concentraciones de 200 mg/Kg de Cr (Fig. 2 y 3). Lo que sugiere la capacidad adaptativa de los hongos que se desarrollan de manera natural en suelos contaminados con este tipo de metales y de las plantas hiperacumuladoras que sin presencia de simbiosis pudieron sobrevivir y desarrollarse en la misma magnitud que el tratamiento con hongos nativos a

altas concentraciones del metal. En general todos los tratamientos en interacción con hongos fueron más eficientes que los tratamientos sin hongo para promover altura de la planta.

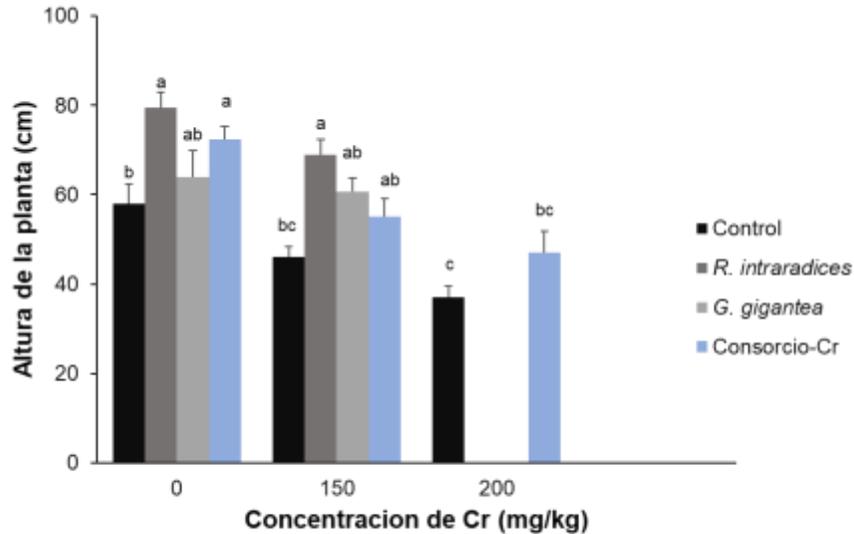


Figura 3. Altura promedio de las plantas *H. annuus*, con Cr (0, 150 y 200 mg/kg) y tres inóculos: *R. intraradices*, *G. gigantea* y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ($P = 0.05$, χ^2 .)

7.1.7 Longitud de la raíz y peso fresco y seco de la parte aérea en plantas de *H. annuus* (girasol) a diferentes concentraciones de Cr (VI).

La longitud de la raíz de las plantas bajo los diferentes tratamientos mostró valores variables, no fueron representativos debido a los bajos porcentajes de sobrevivencia de las plantas. Sin embargo, se observó que la longitud de la raíz de las plantas que crecieron bajo exposición de Cr (VI) fue menor en comparación con los controles sin el metal (Fig. 4). Además, se muestra que, aunque las raíces en todos los tratamientos se vieron afectadas en presencia de Cr, en los tratamientos con 150 mg/kg de este metal con los inóculos de *R. intraradices* y *G. gigantea* las raíces se vieron menos afectadas que las plantas control.

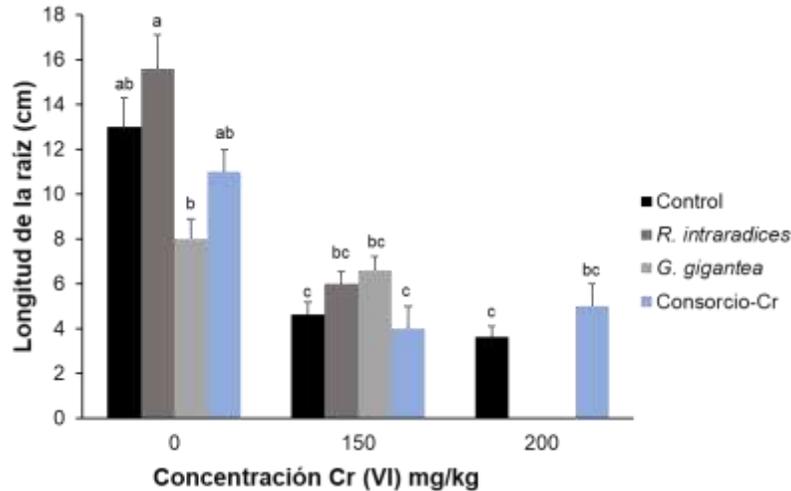


Figura 4. Longitud de la raíz de *H. annuus*, con Cr (0, 150 y 200 mg/kg) y tres inóculos: *R. intraradices*, *G. gigantea* y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ($P = 0.05 \chi^2$.)

En lo que respecta al peso fresco y seco de la parte aérea, se observó el efecto positivo de los HMA en el desarrollo de biomasa de la planta en sustrato no contaminado, ya que los tratamientos con los inóculos *R. intraradices* y Consorcio-Cr registraron mayor peso seco de las plantas con respecto al control. Sin embargo, en presencia de Cr ocurrió lo contrario a lo observado en las raíces ya que en la concentración de 150 mg/kg de Cr el peso de las plantas en asociación con HMA disminuyó respecto al control, y a 200 mg/Kg del metal la biomasa de la parte aérea se vio favorecida en el tratamiento con el Consorcio de HMA proveniente de suelos contaminados (Fig. 6). Lo que indica que diferentes especies de HMA interactúan de manera diferente con la planta, promoviendo desarrollo de raíces o bien influir en un mayor desarrollo de las plantas.

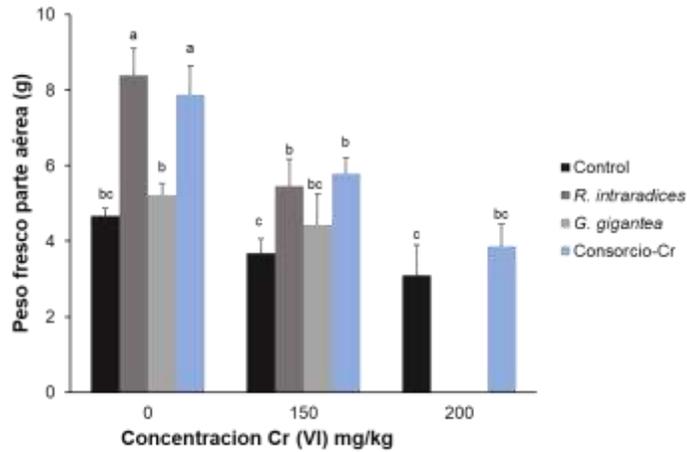


Figura 5. Peso fresco de la parte aérea de plantas de *H. annuus* sin Cr y con Cr (48.5, 97.1 y 194.2 mg/kg) y tres inóculos: *R. intraradices*, *G. gigantea* y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P = 0.05$, χ^2).

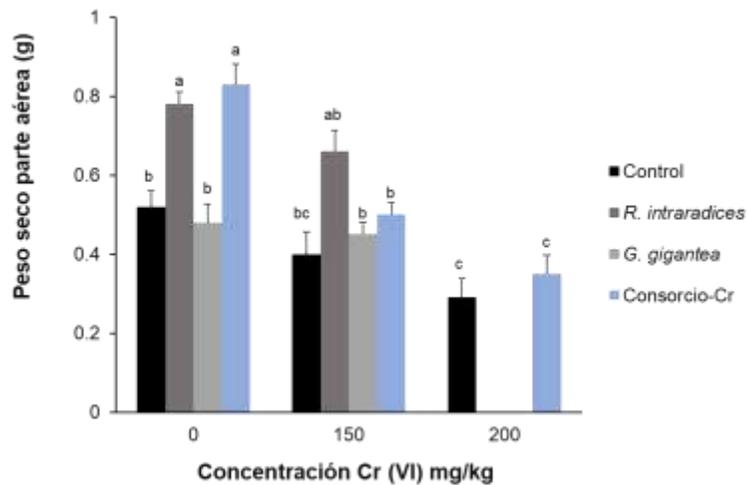


Figura 6. Peso seco de la parte aérea de *H. annuus*, con Cr (0, 150 y 200 mg/kg) y tres inóculos: *R. intraradices*, *G. gigantea* y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ($P = 0.05$, χ^2).

7. 2 RESULTADOS DEL EXPERIMENTO B: *Tagetes erecta* L. suplementada con 48.5, 91.7 y 194.2 mg/kg de Cr (VI).

7.2.1 Porcentaje de sobrevivencia en plantas de *T. erecta* (cempasúchil) expuestas a diferentes concentraciones de Cr (VI).

Las plantas se mantuvieron en el invernadero 12 semanas y la sobrevivencia se determinó al concluir este tiempo, con la cosecha de las plantas. En todos los tratamientos control sin adición de Cr (VI) (sin y con HMA), sobrevivieron el 100% de las plantas. En los tratamientos contaminados con diferentes concentraciones de Cr, aunque la sobrevivencia disminuyó, no fue significativo con respecto a los controles, registrándose porcentajes mayores al 80% dependiendo del tratamiento (Cuadro 9). A la más alta concentración de Cr el tratamiento menos efectivo fue el consorcio de HMA nativos provenientes de suelos contaminados (83.4%) y el más efectivo fue *R. intraradices* en el que las plantas tuvieron 100 % de sobrevivencia. Evidenciando que la eficiencia de la asociación varía dependiendo de la especie fúngica con la que se asocie la planta.

Cuadro 9. Porcentaje de sobrevivencia en plantas *T. erecta* a las 12 semanas de crecimiento. Se analizaron 16 tratamientos, con y sin inoculación con HMA y cuatro concentraciones diferentes de Cr (VI).

Tratamiento	0 Cr	48.5 Cr	97.1 Cr	194.2 Cr
Control	100%	91.70%	100%	91.70%
<i>R. intraradices</i>	100%	91.70%	83.40%	100%
<i>G. gigantea</i>	100%	91.70%	100%	91.70%
Consorcio-Cr	100%	100%	83.40%	83.40%

7.2.2 Colonización micorrízica en las raíces de raíz de las plantas de *T. erecta* (cempasúchil).

La figura 7 muestra los resultados obtenidos en este trabajo para colonización por parte de los HMA. Se corroboró la ausencia de colonización en los tratamientos control. Se evidencia que el inóculo *G. gigantea* colonizó en mayor porcentaje (~60%) a las plantas de cempasúchil en todos los tratamientos, mostrando diferencia significativa en comparación con los demás tratamientos (P

= 0.05, Tukey). La colonización de las plantas por el inóculo de *R. intraradices* fue significativamente mayor a la concentración de 97.1 mg/Kg que, en el resto de las concentraciones, incluido el control. El consorcio-Cr fue el inóculo que presentó menores porcentajes de colonización en todos los tratamientos incluidos los controles. Estos resultados muestran que la infectividad de los HMA para colonizar a la planta de cempasúchil cuando están bajo diferentes concentraciones de estrés por Cr (VI), varía dependiendo de la especie fúngica, existiendo algunas más tolerantes a la presencia del metal, que se refleja en una mayor infectividad y por lo tanto en una mayor colonización.

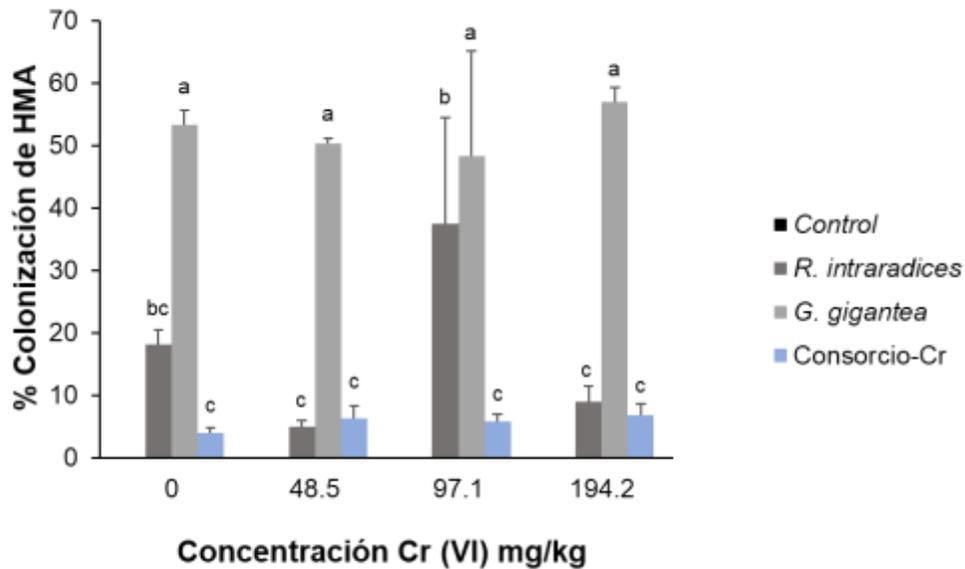


Figura 7. Porcentaje de colonización de raíces de *T. erecta* inoculadas con *R. intraradices*, *G. gigantea* y un consorcio-Cr en raíces de plantas de *T. erecta* expuestas a diferentes concentraciones de Cr (VI). Letras diferentes indican diferencia significativa (P = 0.05, Tukey).

En la Fig. 8, se puede observar la presencia de estructuras fúngicas en el interior de la raíz de *T. erecta*. En las raíces de las plantas crecidas en el suelo con 19.2 mg/Kg Cr con *R. intraradices* y Consorcio-Cr (A y B) se observa presencia de vesículas e hifas intraradicales. Así como la presencia de hifas extraradicales (micelio externo). En el caso de *G. gigantea* (C) que fue la que tuvo porcentajes de colonización más altos, se pudo observar además la formación de arbusculos, que son las estructuras más importantes para el intercambio y paso de nutrientes hacia la planta. La presencia de estas estructuras sustenta el éxito de la colonización micorrízica en este trabajo.

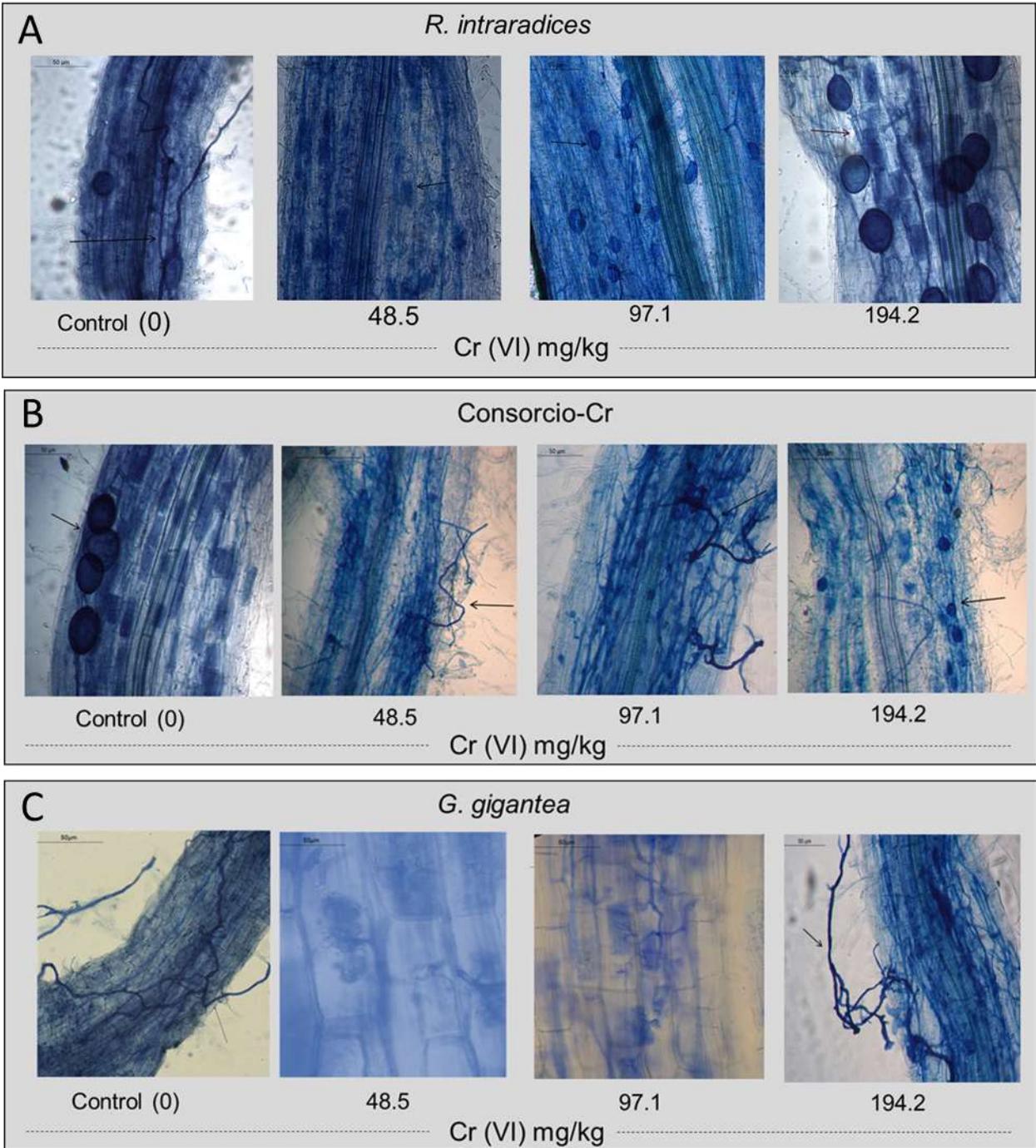


Figura 8. Imágenes de raíces colonizadas de *T. erecta* con *R. intraradices* (A), consorcio-Cr (B) y *G. gigantea* (C) expuestas a concentraciones de Cr (VI). Flechas negras muestran estructuras fúngicas (hifas, vesículas, micelio externo, coils y arbusculos).

7.2.3 Altura y peso de plantas de *T. erecta* (cempasúchil) crecidas en cuatro diferentes concentraciones de Cr (VI).

Los valores de la altura de la planta fueron medidas al final del experimento, a las 12 semanas. La inoculación con *R. intraradices* incrementó de manera significativa el tamaño de las plantas, con respecto a los demás tratamientos en los sustratos sin Cr y con todas las concentraciones del metal probadas ($P = 0.05$, Tukey), por lo que fue el inóculo más eficiente para promover crecimiento de la parte aérea en *T. erecta*, seguido de *Gigaspora gigantea*. A mayor concentración de Cr se observó una disminución en la altura de las plantas en todos los tratamientos (Fig. 8). Sin embargo, se pudo observar el efecto positivo que tuvo la interacción con los diferentes inóculos de HMA sobre la altura en las plantas, ya que en todas las concentraciones de Cr probadas (0 a 194.2 gr/kg de sustrato) la altura fue significativamente mayor que en las plantas control para la mayoría de los tratamientos con HMA ($P = 0.05$, Tukey) (Fig. 9).

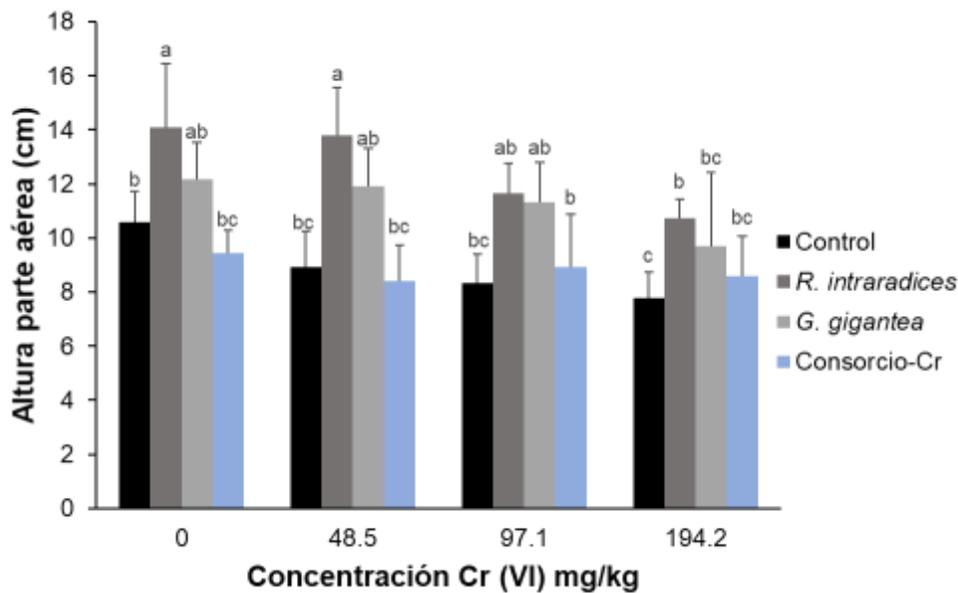


Figura 9. Altura promedio de las plantas *T. erecta*, con Cr (0, 48.5, 97.1 y 194.2 mg/kg) sin HMA y con los inóculos: *R. intraradices*, *G. gigantea* y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P = 0.05$, Tukey).

Con lo que respecta al peso fresco de la parte aérea, nuevamente las plantas sin presencia de HMA presentaron la menor biomasa en todos los tratamientos probados. *G. gigantea* mostró

ser más eficiente para el desarrollo de las plantas en presencia de Cr (VI). *R. intraradices* en cambio mostro ser más eficiente cuando no hubo contaminación por Cr. Aunque el Cr afectó en el desarrollo de la biomasa de la planta, se pudo corroborar el aumento en la tolerancia de *T. erecta* a la presencia de Cr cuando se encuentra en interacción con HMA (Fig. 10).

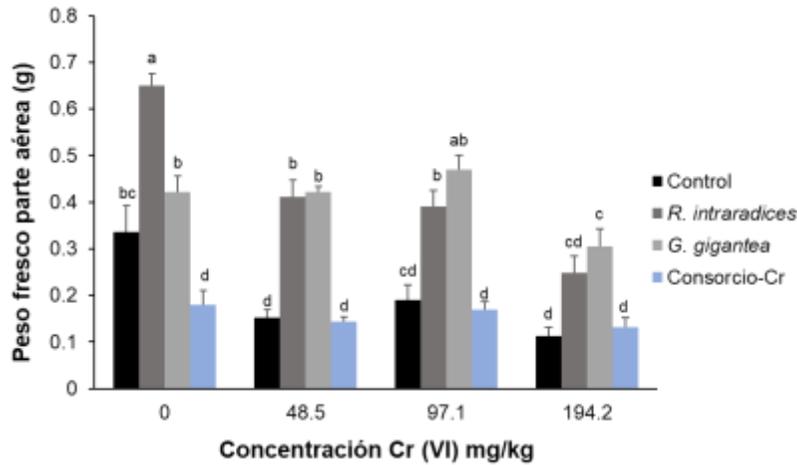


Figura 10. Peso fresco de la parte aérea de plantas de *T. erecta*, sin Cr y con Cr (48.5, 97.1 y 194.2 mg/kg) y tres inóculos: *R. intraradices*, *G. gigantea* y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa (P = 0.05, Tukey).

En el peso seco de la parte área presento un comportamiento similar al mencionado anteriormente, el peso disminuyo conforme aumenta la concentración de Cr (VI) y se pudo apreciar que la interacción con HMA benefició a la planta. *R. intraradices* fue el más eficiente y la significancia más alta se observó con Cr a 48.5 mg/kg en donde el peso de las plantas fue más alto (0.091 gr) con respecto a los demás tratamientos (P = 0.05, Tukey) (Fig. 11).

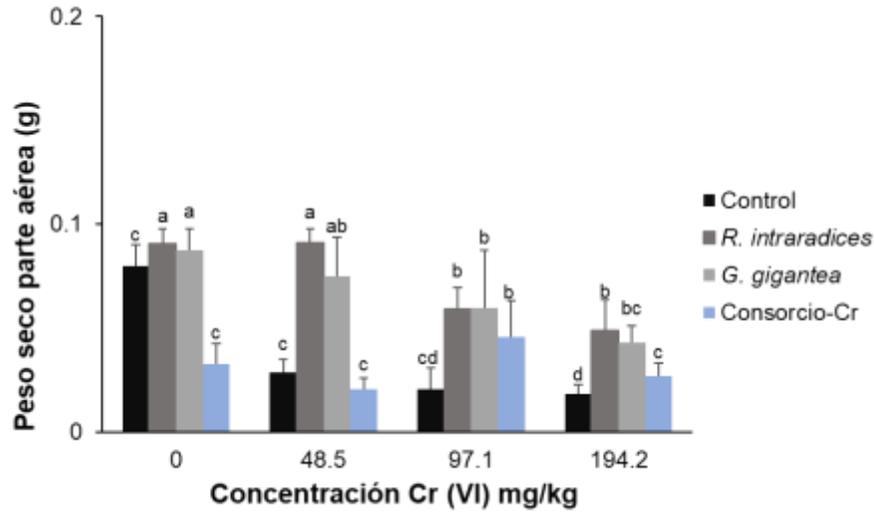


Figura 11. Peso seco de la parte aérea de plantas de *T. erecta*, sin Cr y con Cr (48.5, 97.1 y 194.2 mg/kg) y tres inóculos: *R. intraradices*, *G. gigantea* y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa (P = 0.05, Tukey).

7.2.4 Longitud de la raíz y peso en plantas de *T. erecta* (cempasúchil) a cuatro diferentes concentraciones de Cr (VI).

Las longitudes de las raíces incrementaron al aumentar la concentración de Cr (VI) en todos los tratamientos, mostrando diferencias significativas entre los tratamientos con HMA y las plantas control (P = 0.05, Tukey). Los tratamientos más eficientes a la concentración de 194.2 mg/kg Cr fueron *G. gigantea* y *R. intraradices* que reportaron longitudes de 36 y 33 cm respectivamente, en promedio (Fig. 12). Se observó que, aunque el inóculo de hongos nativos no fue eficiente promoviendo el crecimiento de la parte aérea de la planta, para el desarrollo de raíces fue más eficiente a concentraciones moderadas de Cr (97.1 %).

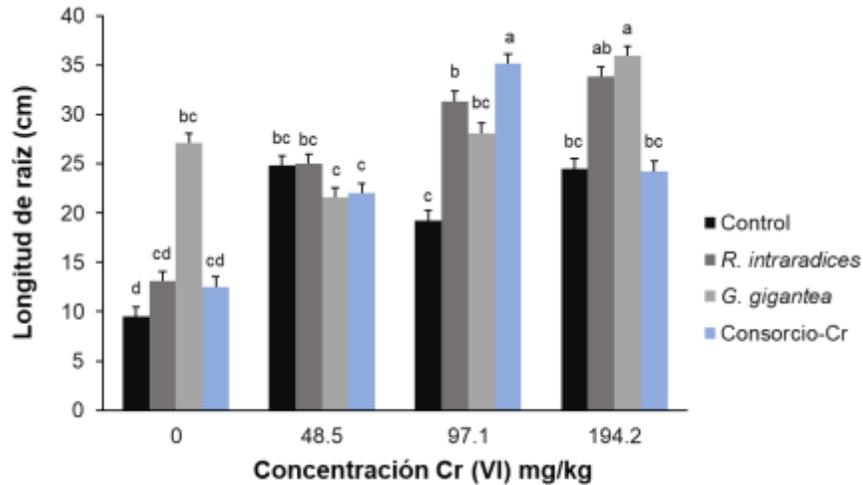


Figura 12. Longitud de la raíz de *T. erecta*, con Cr (0, 48.5, 97.1 y 194.2 mg/kg) y los inóculos: *R. intraradices*, *G. gigantea* y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P = 0.05$, Tukey).

Los pesos fresco y seco de raíz fueron hasta un 48% más alto en los tratamientos que estaban inoculados con HMA en todas las concentraciones de Cr (VI) en comparación con las plantas control ($P = 0.05$, Tukey) (Fig. 13 y 14). Y a la mayor concentración de Cr (194.2), los valores significativamente más altos se presentaron en los tratamientos con *G. gigantea* y Consorcio-Cr para peso fresco (Fig. 13), así como *G. gigantea* y *R. intraradices* en el caso del peso seco ($P = 0.05$, Tukey) (Fig. 14). Lo que refleja la capacidad de algunos inóculos para facilitar la absorción de agua o bien el aumento de biomasa.

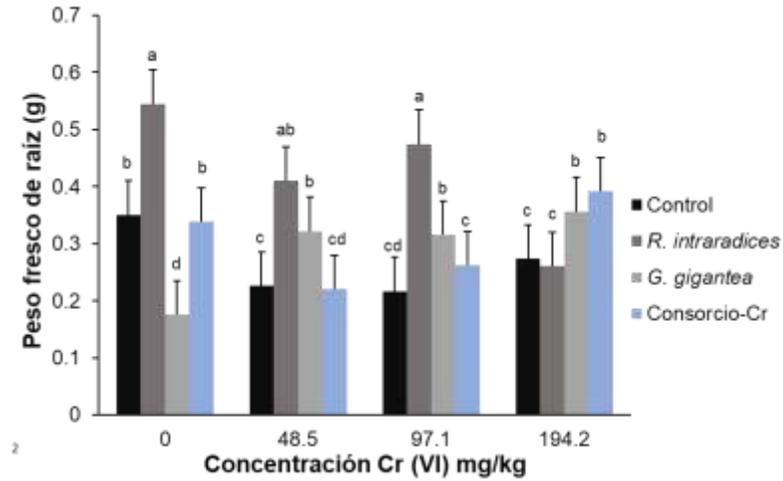


Figura 13. Peso fresco de la raíz de *T. erecta*, con Cr (0, 48.5, 97.1 y 194.2 mg/kg) y los inóculos: *R. intraradices*, *G. gigantea* y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa (P = 0.05, Tukey).

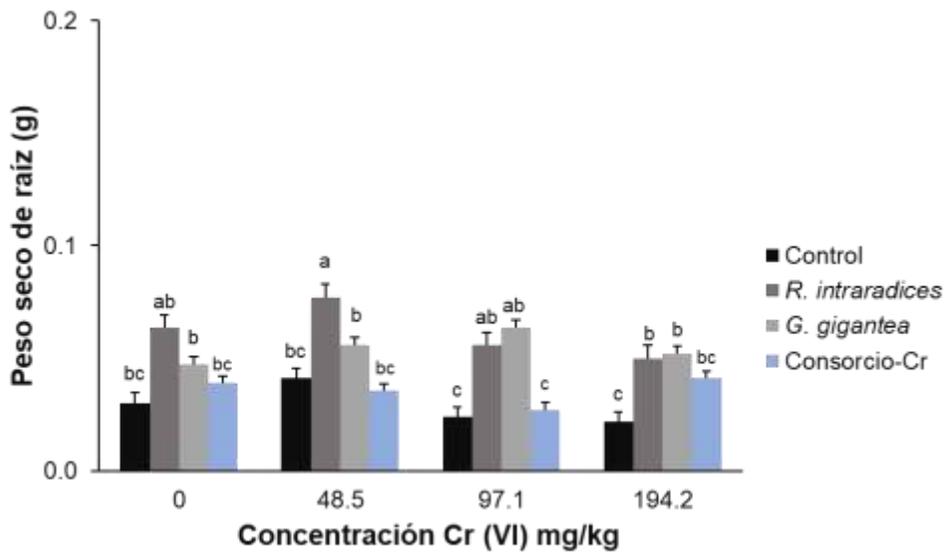


Figura 14. Peso seco de la raíz de *T. erecta*, con Cr (0, 48.5, 97.1 y 194.2 mg/kg) y los inóculos: *R. intraradices*, *G. gigantea* y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos (P = 0.05, Tukey).

7.2.5 Número de hojas y botones de *T. erecta* (cempasúchil) a cuatro diferentes concentraciones de Cr (VI).

En general en las plantas que se encontraban colonizadas por HMA se incrementó el rendimiento vegetal en número de hojas y botones, en todos los tratamientos con y sin adición de Cr (Fig. 15). En especial con los inóculos que presentaron los mayores porcentajes de colonización que fueron *R. intraradices* y *G. gigantea* y en los que la cantidad de hojas y brotes fue significativamente mayor que en los controles sin hongos en los diferentes tratamientos con Cr ($P = 0.05$, Tukey). Mostrando que la interacción favorece la adaptación de las plantas aún a las más altas concentraciones probadas, ya que, aunque el rendimiento vegetal disminuyó, las plantas sobrevivieron.

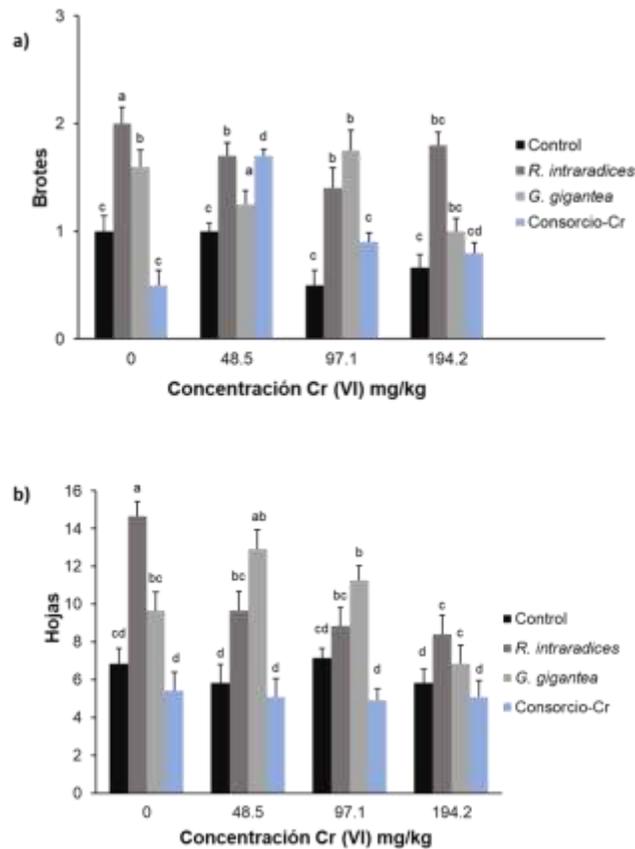


Figura 15. a) Número de hojas y b) botones de *T. erecta*, con Cr (0, 48.5, 97.1 y 194.2 mg/kg) y los inóculos: *R. intraradices*, *G. gigantea* y un consorcio-Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P = 0.05$, Tukey).

7.2.6 Determinación de área foliar mediante el análisis de imágenes digitales con el software winRIZHO.

Se encontró diferencias significativas en las plantas de cempasúchil (*T. erecta*) sometidas a las diferentes concentraciones de Cr (VI). Las plantas de todos los tratamientos en la concentración de 194.2 mg/kg de Cr presentaron una reducción significativa del área foliar. En interacción con los HMA *T. erecta* presentó área foliar significativamente más altas ($P = 0.05$, Tukey), tanto en los tratamientos sin Cr y con Cr, comparadas con las plantas sin inóculos fúngicos (Fig. 16). Observando, además que, en ausencia del socio fúngico, las plantas se vieron afectadas disminuyendo el área foliar aún a las concentraciones más bajas de Cr, mientras que en interacción con hongos la disminución más notoria del área foliar se observó únicamente a la concentración más alta del metal.

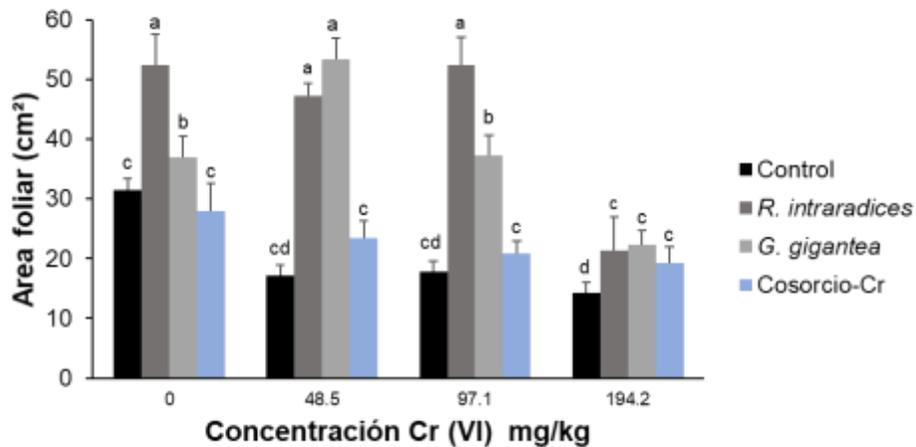


Figura 16. Área foliar de las plantas *T. erecta* inoculadas con *R. intraradices*, *G. gigantea* y Consorcio-Cr expuestas a diferentes concentraciones de Cr. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P = 0.05$, Tukey).

7.3 Análisis de absorción de Cr (VI) por las plantas *H. annuus* (girasol) y *T. erecta* (cempasúchil).

Debido a la alta tasa de mortandad que se presentó en todos los tratamientos de *H. annuus*, no fue posible realizar las pruebas de absorción de Cr, debido a la baja disponibilidad de tejido para llevar a cabo las digestiones necesarias para realizar esta prueba.

La concentración de Cr (VI) presente en la raíz y tallo de las plantas de *T. erecta*, se obtuvo mediante el análisis de espectrometría de absorción atómica. La Fig. 17 muestra los valores de acumulación de Cr en las raíces bajo los diferentes tratamientos. La concentración de Cr en las raíces fue significativamente más alta conforme aumentó la concentración de Cr en el sustrato y la presencia de HMA incrementó de manera significativa la acumulación de Cr, en comparación con las plantas sin hongos ($P = 0.05$, Tukey). Dicho aumento fue significativamente más alto en los tratamientos con *G. gigantea* y *R. intraradices* en la concentración Cr 194.2 mg/kg con más de 70 mg/Kg de Cr acumulado en las raíces.

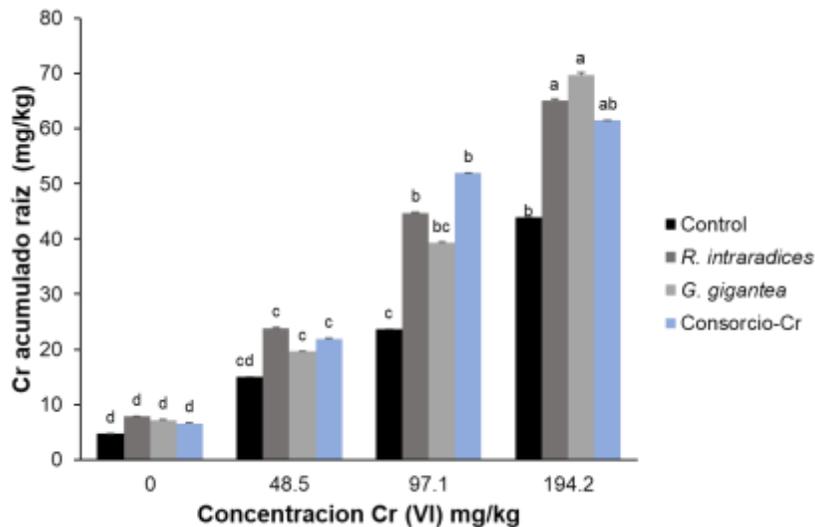


Figura 17. Concentración de Cr en las raíces inoculadas (*R. intraradices*, *G. gigantea* y Consorcio-Cr) y no inoculadas de las plantas *T. erecta* (cempasúchil). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$, Tukey).

Las concentraciones de Cr en la parte aérea se representan en la Fig. 18. Presentando resultados con un comportamiento distinto al de los de la acumulación en la raíz. Las plantas no inoculadas presentaron una mayor acumulación de Cr en la parte aérea que algunos de los tratamientos con HMA. En la concentración más alta 194.2 mg/kg la acumulación en la parte aérea por plantas no inoculadas con HMA y aquellas inoculadas con *G. gigantea* fue significativamente mayor que el resto de los tratamientos con valores por arriba de 55.0 mg/kg Cr.

Observando que diferentes especies de HMA pueden interactuar de manera diferente con las plantas, ya sea acumulando el Cr en la raíz o ayudando a su translocación hacia la parte aérea de la planta.

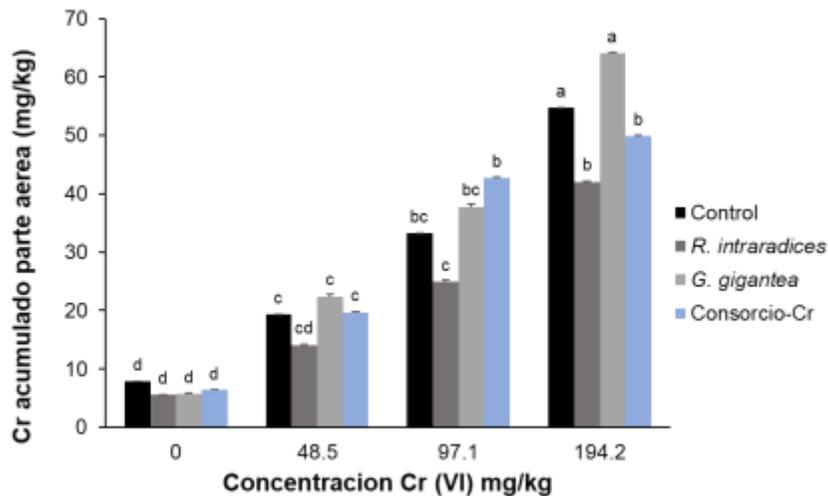


Figura 18. Concentración de Cr en las partes aéreas de las plantas *T. erecta* (cempasuchil) inoculadas (*R. intraradices*, *G. gigantea* y Consorcio-Cr) y no inoculadas. Letras diferentes significan diferencias significativas por la prueba Tukey $P \leq 0.05$

La concentración de Cr. total en las plantas a las más altas concentraciones de Cr en el sustrato fue significativamente más alta en el tratamiento con *G. gigantea* y el cromo absorbido por las plantas fue mayor en interacción con HMA que cuando la planta actúa sola por su característica de acumuladora de metales (Fig. 19).

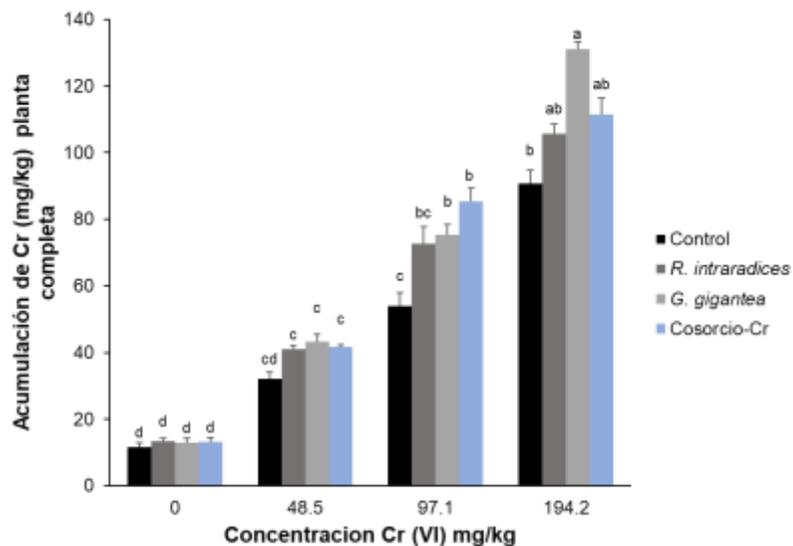


Figura 19. Concentración de Cr total en las plantas *T. erecta* (cempasuchil) inoculadas (*R. intraradices*, *G. gigantea* y Consorcio-Cr) y no inoculadas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$, Tukey).

En la Fig. 20 se muestra los valores calculados para el factor de translocación. El factor de traslocación presenta valores entre 0.31 a 1.4 indicando que esta especie trasportó cantidades de Cr consideras para definir a las plantas como acumuladoras e hiperacumuladora de metales pesados. También se observa que las plantas sin presencia de HMA presentan un factor de traslocación más alto que cuando el hongo está presente, lo que indica que una de las funciones de estos hongos fue la retención de una mayor cantidad del Cr en el sistema radicular de la planta.

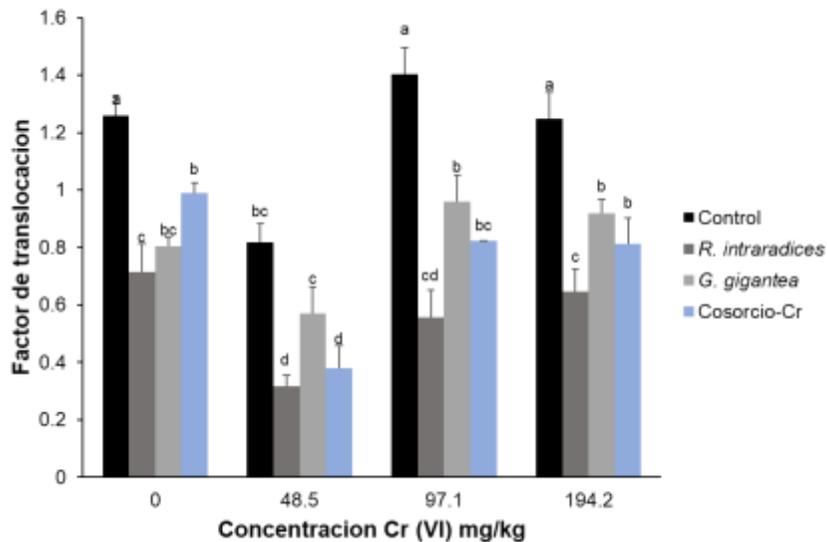


Figura 20. Factor de translocación de la raíz a la parte aérea de las plantas *T. erecta* (cempasuchil) expuestas a las diferentes concentraciones de Cr (VI) e inoculadas (*R. intraradices*, *G. gigantea* y Consorcio-Cr) y no inoculadas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$, Tukey).

7.3.1 Factor de bioconcentración y traslocación de metales pesados en las plantas.

En este estudio, ninguna de las plantas de *T. erecta* bajo distintos tratamientos acumuló concentraciones de Cr > 1000 mg/kg (Fig. 19) por lo que no mostró ser hiperacumuladora de Cr (Baker y Brooks, 1989).

Comparando el BCF, (Fig. 21,22 y 23) pudimos analizar la capacidad de *T. erecta* para tomar los metales de los suelos y traslocarlos a la parte aérea sin la inoculación de HMA por que se obtuvieron valores mayores a 1 en la concentración de 194.2 mg/kg. Las plantas tolerantes tienden a restringir las transferencias suelo - raíz y raíz - parte aérea, por lo que tienen mucho menos acumulación en su biomasa, mientras que las hiperacumuladoras participan activamente y traslocan los metales en su biomasa aérea. Las plantas en mayor número de tratamientos presentan valores de TF (Fig.20) y FBC (21 y 22) menores de uno, por lo que no serían adecuadas para la fitoextracción.

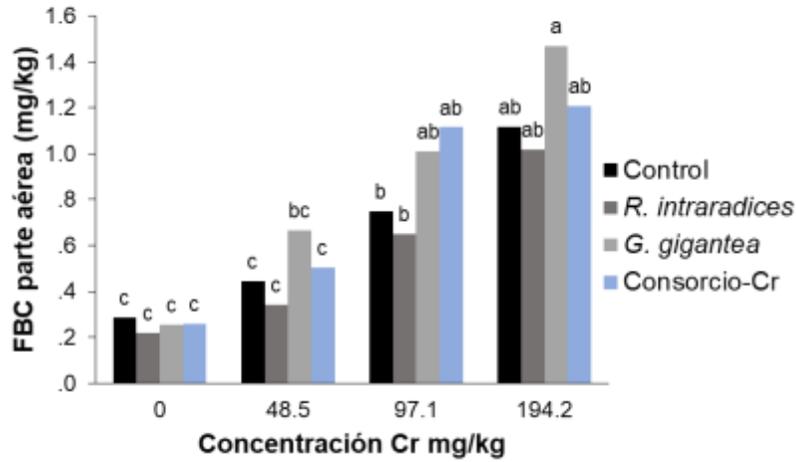


Figura 21. Factor de bioconcentración parte aérea de las plantas *T. erecta* (cempasuchil) crecidas en suelo con diferentes concentraciones de Cr (VI), e inoculadas (*R. intraradices*, *G. gigantea* y Consorcio-Cr) y no inoculadas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$, Tukey).

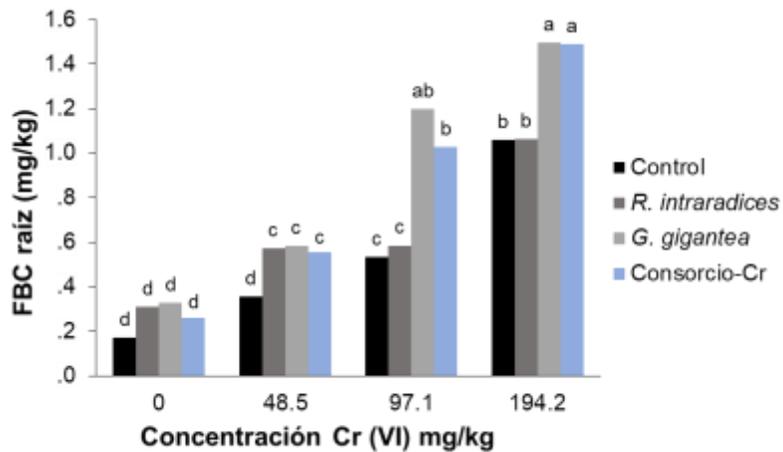


Figura 22. Factor de bioconcentración de la raíz de las plantas *T. erecta* (cempasuchil) expuestas a las diferentes concentraciones de Cr (VI) e inoculadas (*R. intraradices*, *G. gigantea* y Consorcio-Cr) y no inoculadas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$, Tukey).

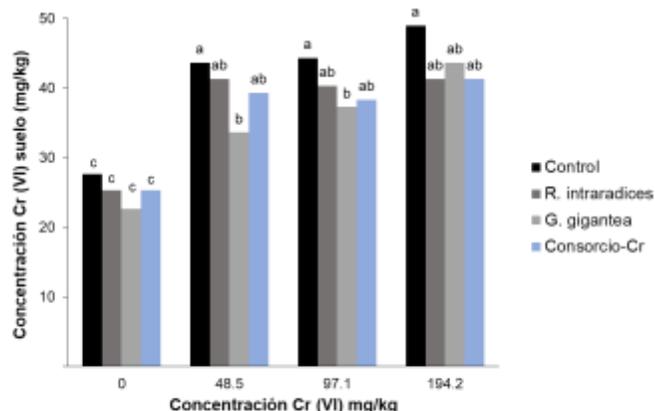


Figura 23. Concentración de Cr en el suelo en donde se crecieron plantas *T. erecta* (cempasuchil) bajo a las diferentes concentraciones de Cr (VI) e inoculadas (*R. intraradices*, *G. gigantea* y Consorcio-Cr) y no inoculadas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$, Tukey).

8. DISCUSIÓN

8.1 Experimento A (girasol).

La contaminación del suelo agrícola por MP en general causa problemas de toxicidad en las plantas, influyendo en el crecimiento y sobrevivencia. La toxicidad del Cr (VI) supone generalmente un efecto negativo en la salud y desarrollo de las plantas, por lo que una mayor reducción en el crecimiento en las plantas contaminadas en relación a las no contaminadas se relaciona con una menor tolerancia de las plantas (Ertani *et al.*, 2017). Los síntomas de toxicidad por Cr (VI) incluyen inhibición o disminución de la germinación, crecimiento de las raíces, crecimiento y desarrollo de las plántulas, disminución en el rendimiento de las plantas (Oliveira 2012; Sangwan *et al.*, 2014; Jaison y Muthukumar, 2017). Estos síntomas mencionados son consecuencia de la disminución de toma de nutrientes y agua, causando modificaciones en la morfología de la planta (Sharmin *et al.* 2012; Ali *et al.*, 2015; Singh *et al.* 2015; Reale *et al.*, 2016). En este sentido los resultados muestran una disminución del crecimiento de la raíz y tallo en

términos de longitud y biomasa (peso seco) lo que nos indica que fueron afectados significativamente por la adición de Cr en el sustrato de crecimiento.

Algunos reportes señalan que el Cr (VI) es tóxico para las plantas agronómicas en concentraciones de aproximadamente 0.5-5.0 mg/L en solución nutritiva y de 5-100 mg/g en el suelo. Davies *et al.*, (2002) menciona que el Cr es tóxico para la mayoría de las plantas superiores a concentraciones de 100 mg/kg en peso seco. En condiciones normales la concentración de Cr en las plantas es inferior a 1µg/g (Oliveira, 2012). Sin embargo, estudios previos han reportado que algunas plantas muestran cierta tolerancia e incluso son capaces de acumular cantidades de Cr >1,000 mg kg⁻¹ (0,1% del peso seco) clasificándolas como hiperacumuladoras de Cr (Reeves y Baker, 2003). En el presente estudio se observó una cierta tolerancia de *H. annuus* al Cr (VI) dependiente de la dosis.

A una concentración de 150 mg/kg, se registró sobrevivencia en todos los tratamientos, aunque en distinto porcentaje y mostrando una menor inhibición del crecimiento y peso seco en comparación con la dosis más alta. Esta cantidad es mucho mayor a la indicada como tóxica, pero considerando que *H. annuus* es una planta reconocida como hiperacumuladora de Cd, Ni y Cr (Turgut *et al.*, 2004; Adesodun *et al.*, 2010) se corroboró la tolerancia de esta planta a ciertas concentraciones. Concentraciones por arriba de 200 mg/kg de Cr fueron tóxicas para las plantas e indujeron síntomas de marchitamiento que afectaron las demás variables vegetativas. Mientras que la concentración 300 mg/kg fue letal para las plantas en los diferentes tratamientos probados. Lo que difiere de lo que se ha encontrado para otras especies que toleran y captan el Cr en sus tejidos como *Spartina argentinensis* que acumula Cr hasta cantidades de 1500 mg/kg (Redondo-Gomez, 2011), *Leersia hexandra* mostrando acumulación en hojas de hasta 600 mg/kg (Zhang *et al.*, 2007), *Napalea cochenillifera* acumula 700 mg/kg de Cr en sus hojas (Adki *et al.*, 2013) y *Pteris vittata* también reportada como hiperacumuladora de Cr (de Oliveira *et al.*, 2016). A pesar de que *H. annuus* es una planta potencialmente hiperacumuladora de Cr, en este estudio mostró signos de fitotoxicidad a este metal a concentraciones de 200 y 300 mg/kg de Cr (VI).

Lo que sugiere que la respuesta de *H. annuus* a las concentraciones más altas utilizadas, puede estar relacionada con los efectos tóxicos del Cr (VI) sobre la obtención de nutrientes, fundamentalmente sobre la incorporación de fósforo a la planta como reporta la bibliografía. Por ejemplo, en un trabajo realizado por Aurazo y Esparza (1995), se encontró que el cromo (VI) en

valores superiores a 70 mg/L inhibe totalmente el crecimiento de la raíz afectando la toma de nutrientes. También podemos atribuir los resultados a los niveles de Cr y la etapa de desarrollo de la planta en la que se aplicó el Cr. De la Rosa *et al.* (2008) mencionan que una concentración de 40 mg/L de Cr en el suelo, no afectó significativamente el desarrollo de la planta y a menor edad presentaron mayor tolerancia al metal en cuestión. Por último, es importante mencionar que estos efectos dependieron en parte de la combinación planta-hongo-Cr, y en general fueron influenciados por las condiciones del suelo.

Diversos estudios han argumentado ampliamente los efectos benéficos de la HMA sobre el crecimiento de las plantas y la tolerancia a la MP (Wang *et al.*, 2012). Los HMA participan en la mejora del crecimiento de las plantas y la resistencia a MP. Sin embargo, la colonización micorrízica de los inóculos de HMA utilizados en las plantas de girasol no estimuló de manera significativa el desarrollo y sobrevivencia de las plantas, la longitud radical y peso seco con y sin exposición a Cr en los tratamientos inoculados con *G. gigantea* y el consorcio-Cr. Lo anterior difiere con lo señalado por Cuenca *et al.* (2007) quienes reportaron que las plantas micorrizadas presentaron mayor peso seco que el control; generalmente este aumento está asociado a un incremento en el área de exploración del sistema radical y por tanto mayor disponibilidad de nutrimentos (Smith y Read, 1997). La efectividad de la colonización micorrízica varió entre los inóculos de HMA. Existen informes contradictorios sobre la efectividad de los hongos micorrízicos en la absorción y tolerancia de metales pesados por las plantas.

Algunos autores muestran que los HMA aumentan la tolerancia de metales pesados en plantas colonizadas (Oryowska *et al.*, 2005), mientras que otros autores informan que los hongos micorrízicos arbusculares a una concentración alta tienen o pueden tener un efecto negativo en la planta, cuyo crecimiento es reprimido (Arriagada *et al.*, 2007), en el sentido de que la respuesta de la planta puede variar en función del grado de colonización. En un estudio realizado por Yang *et al.*, (2015) reportaron que la colonización micorrízica de *R. pseudoacacia* por *Funneliformis mosseae* se vio afectada por los niveles de estrés de Pb. En otro estudio se encuentra que los HMA también han demostrado tener efectos neutros en las plantas colonizadas y bajo estrés de Pb y Zn (Diaz *et al.*, 1996). Así mismo, Ferrera-Cerrato y Alarcón (2008) señalan que la actividad fúngica representa un costo para la planta, la cual aporta fuentes energéticas carbonadas para el metabolismo del hongo, de aquí la generación de un sistema de beneficio mutuo.

El inóculo de *R. intraradices*, incrementó el peso seco de la parte aérea y longitud de la raíz en comparación con el resto de los inóculos en las plantas de *H. annuus* (girasol), a pesar de que presentó menor porcentaje de colonización micorrízica. Lo anterior no demuestra que los inóculos *G. gigantea* y consorcio-Cr no sean eficientes, pero si confirma que existen diferencias en la relación costo/beneficio cuando se emplean inóculos de HMA y que la interacción puede variar dependiendo de la especie fúngica y de la planta. Por ejemplo, el ecotipo *R. irregularis* aislado por Hildebrandt *et al.* (1999) de la rizosfera de la especie metalófito *Viola calaminaria* demostró consistentemente ser más eficaz para conferir tolerancia HM en una variedad de plantas (*Solanum lycopersicum*, *Zea mays* y *M. truncatula*) que un ecotipo de la misma especie aislada de un suelo contaminado (Kaldorf *et al.*, 1999).

De tal forma que, los factores que deben considerarse en la eficiencia de los HMA son la agresividad, infectividad y capacidad de protección. Las condiciones de infectividad y efectividad de los HMA dependen no solo del simbionte, sino también de las condiciones en la que se desarrolle la asociación, debido a que el hongo también es afectado por las condiciones del sustrato en el que se encuentra, por ejemplo, pH 6.6 influye sobre la solubilidad del fósforo, altos niveles de P en el suelo pueden inhibir la infectividad de los HMA, lo cual puede afectar la función de los HMA durante el proceso de toma de nutrientes (Guzman-Plazola *et al.*, 1988). En general, se considera que los HMA se adaptan al pH del suelo de su origen y por ello se puede convertir en un factor limitante para su establecimiento. Otro factor físico que pudo afectar el funcionamiento de las micorrizas arbusculares es la cantidad de materia orgánica que se encuentra en el suelo ya que influye sobre la estructura, pH, la cantidad de nutrientes y la retención de humedad en el suelo.

El efecto de la compactación se refleja en características del suelo como la estructura al mostrar una porosidad ligeramente baja, reduciendo su fertilidad y la distribución de las raíces de las plantas y de las hifas de las micorrizas arbusculares en la rizosfera (Jeffries y Barea, 1999).

Por lo anterior es importante seguir realizando estudios con propósito de obtener resultados más significativos, que nos guíen a una mejor comprensión de lo que ocurre con las interacciones en el suelo contaminado con metales pesados.

8.2 Experimento B (cempasúchil).

Existen investigaciones que demuestran la capacidad de *T. erecta* como una planta acumuladora de Pb (Bosiacki, 2009), Cd (Liu *et al.*, 2011) y Ni (Bosiacki y Wojciechowska, 2012). Esto hace a *T. erecta* una planta de interés en la biorremediación de suelos contaminados con MP en este caso el Cr (VI). Los altos porcentajes de sobrevivencia de *T. erecta* a concentraciones prueba que es una especie tolerante al Cr (VI) en concentraciones de 48.5, 97.1 y 194.2 mg/kg.

Además, el éxito de la colonización micorrízica evidenciada por la presencia de estructuras fúngicas como hifas en el interior de la raíz (Harley y Smith, 1983), tuvo efectos significativos en los parámetros de crecimiento. Realizando una comparación entre los cuatro tratamientos inoculados con *R. intraradices*, *G. gigantea* y Consorcio-Cr suplementadas con las diferentes concentraciones de Cr (VI) (0, 48.5, 97.1 y 194.2 mg/kg), podemos evidenciar la presencia de diferentes estructuras desarrolladas al interior de la raíz. Esto podría sugerir que la concentración de Cr (VI) afecta el desarrollo del hongo y lo obliga a crear estructuras de reserva como las vesículas, con el fin de soportar los niveles de estrés al que está expuesto; por ello, se encontraron una mayor cantidad de estructuras tipo vesículas en los tratamientos con concentraciones más altas, 97.1 y 194.2 mg/kg en los inóculos *R. intraradices* y Consorcio Cr y menor cantidad en los tratamientos de 0 y 48.5mg/kg, en las raíces en el tratamiento *G. gigantea* se encontró la colonización de otros HMA, posiblemente del género *Rhizophagus*, evidenciado por la presencia de vesículas ya que el género *Gigaspora* no genera vesículas. Las vesículas cumplen la función de almacenamiento de lípidos (Azcón, 2000; Barker *et al.*, 1998). Cabe resaltar que los análisis realizados en los tratamientos que no fueron inoculados con hongos micorrízicos, arrojaron resultados negativos acerca de la presencia de hongos, garantizando así que estos no fueron contaminados durante el proceso de siembra y montaje del experimento.

Los parámetros de crecimiento de las plantas se usan como indicador de toxicidad de los metales pesados, especialmente en el contexto de la fitorremediación en donde se requiere plantas ideales que posean características múltiples, como un crecimiento rápido con alta producción de biomasa y un sistema de enraizamiento profundo y la capacidad de tolerar y acumular una amplia gama de metales pesados en sus partes aéreas (Clemens *et al.*, 2002). Las plantas absorben los metales a través de la raíz y la almacenan en la parte aérea, el límite de tolerancia de las plantas lo

define en gran medida el crecimiento. Todos estos atributos en las plantas son importantes para poder definir a una planta como candidata para ser utilizada en la remediación de suelos contaminados con Cr.

La altura de la parte aérea de *T. erecta* crecida en concentraciones de Cr (VI) en el suelo y en simbiosis con inóculos de HMA registró ligeras reducciones en el nivel más alto de Cr (194.2 mg/kg) con respecto al control, la poca variación en la altura puede estar demostrando que *T. erecta* tolera las concentraciones de Cr (VI) coincidiendo con otras especies tolerantes de Cr (Wyszkowski y Radziemska, 2010, 2013). En cambio se evidencia una clara diferencia en la altura cuando estuvieron inoculadas con HMA en las diferentes concentraciones de Cr, especialmente cuando formaron simbiosis con *R. intraradices*, esto mismo fue observado por Castillo *et al.* (2011) y Ling-Zhi *et al.* (2011) para *T. erecta* colonizadas por *R. intraradices* contaminadas con Cu y Cd respectivamente.

El crecimiento reducido de las plantas bajo estrés de Cr (VI) y la subsiguiente mejoría por HMA también reportan Davies *et al.*, (2001) para *H. annuus* y Wu *et al.*, (2014) para *T. platyepidum*. Los HMA mejora la resistencia de las plantas al estrés de Cr, a través de su contribución activa en la absorción de nutrientes (fósforo) y agua (Ling-Zhi *et al.*, 2011). Como también los confirman Ling-Zhi *et al.* (2011) en *T. erecta* con HMA encontrando una respuesta ante el impacto nocivo de Cd.

Los datos registrados para peso fresco y seco en los tratamientos con concentración de 194.2 Cr mg/kg fueron menores respecto a las plantas sin Cr (Control). Sin embargo, mostraron una clara respuesta mejorada ante la asociación con los HMA. Por ejemplo, plantas inoculadas con *G. gigantea* en la concentración de Cr 97.1 mg/kg tenían 0.47 g de peso fresco mientras que, las plantas sin inocular (a esta misma dosis) el peso promedio era de 0.18 g. Existiendo un aumento de 61.7 % de peso fresco en este tratamiento. La reducción del peso seco fue más marcada dependiendo del aumento de la concentración de Cr. Esta disminución del peso seco presentado por la planta pudo ser una consecuencia de la disminución del número y tamaño de las hojas como lo demuestra los resultados para número de hojas y área foliar. Esta última es una variable importante ya que la cantidad de energía fotosintética depende del área foliar (Gill *et al.*, 2015). Por tanto, el impacto del Cr (VI) en la disminución del área foliar y biomas tanto para las plantas inoculadas como las no inoculadas, fue la toxicidad del metal en las hojas que se acompaña por

una disminución de la fotosíntesis, como lo hemos mencionado, pero además induce a la clorosis y necrosis de las hojas, siendo la última variable la más notable visualmente. En el caso de las plantas inoculadas con *R. intraradices*, *G. gigantea* y Consorcio-Cr en la concentración más alta Cr 194.2 mg/kg la reducción es menor que en el tratamiento sin inocular. En los tratamientos Cr (VI) 48.5 y 97.1 mg/kg en combinación con *R. intraradices*, *G. gigantea* esta reducción no fue significativa respecto al control.

En relación al párrafo anterior los antecedentes bibliográficos para diferentes especies vegetales indican que el Cr (VI) no tiene ninguna función biológica conocida en la fisiología y metabolismo bioquímico de las plantas (Reale *et al.*, 2016). Lo que se explica lo encontrado en este estudio. El nivel excesivo de Cr en los tejidos de las de las plantas puede provocar efectos tóxicos en factores fisiológicos, morfológicos y bioquímicos (UdDin *et al.*, 2015). La toxicidad del metal generalmente se atribuye a un sistema muy complejo de interacciones metálicas con procesos genéticos, señales y vías metabólicas y macromoléculas celulares (Eleftheriou *et al.*, 2015; Kumari *et al.*, 2016). Se ha documentado la toxicidad de cromo en la reducción del crecimiento de la planta, mediante modificaciones de la membrana celular y el cloroplasto, clorosis en las hojas, daño en las células de la raíz, disminución del contenido de pigmentos, al perturbar las relaciones del agua y la nutrición mineral, y alterar actividades enzimáticas (Ali *et al.*, 2015; Reale *et al.*, 2016). Lo que coincide con los efectos visuales encontrados en las plantas en exposición a Cr (VI), principalmente en la concentración Cr (VI) 194.2 mg/kg.

8.3 Experimento C (cempasúchil).

Se observaron concentraciones de Cr en las plantas de todos los tratamientos en diferentes cantidades, aumentando en los niveles más altos (194.2 mg/kg). Es importante tener en cuenta que, según nuestros resultados, las plantas en las que no se adiciono Cr (VI) presentaron concentraciones de Cr en menor cantidad, lo que supone presencia de Cr en las plantas de manera natural. Las concentraciones de Cr en las raíces fueron superiores al de la parte aérea con micorrizas, estos resultados son similares con los que reportan Zayed *et al.*, (2003) con plantas de *H. annuus*. En general se conoce que el cromo se retiene en las vacuolas y en las paredes celulares de las células de la raíz con poca movilidad dentro de la planta. También se ha encontrado del

aumento en las concentraciones de Cr en las partes aéreas en mayor cantidad en suelos suplementados con diferentes concentraciones de Cr.

En el caso de las plantas no inoculadas, la absorción fue mayor que en la parte aérea en comparación con la absorción en la raíz. Sin embargo, en la absorción total de la planta fue mayor cuando fueron inoculadas con los HMA. Esto podría ser explicado de la siguiente manera, la combinación de las plantas con los HMA tuvo un efecto sinérgico en la absorción de Cr (VI) en la raíz, secuestrando el Cr en esta estructura y evitando su traslocación, que podría estar indicando un mecanismo de acción de los HMA ante la exposición al metal, teniendo un efecto protector hacia la parte aérea de las plantas. Hai-Hong *et al.*, 2017 mencionan que las micorrizas generalmente aumentaron las concentraciones de Pb, Zn, Cu y Cd en las raíces y disminuyeron las concentraciones en los brotes de *L. perenne* y *F. arundinacea*. Sin embargo, la absorción y acumulación varió según la concentración del cromo y del inóculo.

En las plantas *T. erecta* se encontró que en los tratamientos con menor nivel de Cr en el suelo los factores de bioconcentración y traslocación tuvieron valores menores a 1, valor que significa que la planta no traslocó Cr a la parte aérea, esto coincide con lo reportado por Jaison y Muthukumar (2016), en la mayoría de las especies de plantas, acerca de que el Cr es poco traslocado hacia las partes aéreas y se retiene principalmente en los tejidos de la raíz. Sin embargo, la eficiencia de traslocación fue mayor en plantas sin inóculos en comparación con las inoculadas, la que pudiera estar demostrando que la planta sin inóculo se comportó en parte como las plantas hiperacumuladoras de Cr por ejemplo *Spartina argentinensis* (Pasto atlántico), *Dyera costulata* (Jelutong) y *Amaranthus dubius* (Amaranto del bazo) que pueden captar y traslocar altos niveles de Cr en los tejidos de los brotes (de Oliveira *et al.*, 2016). Otros experimentos de campo prueban la absorción y acumulación de *T. erecta* de metales como el Cd y Cu a concentraciones de 7.0 y ~310 mg/kg en la raíz y en la planta completa respectivamente (Lal *et al.*, 2008 y Castillo *et al.*, 2011). Bosiacki y Wojciechowska (2012) reportan a *Tagetes erecta* como hiperacumuladora de Ni, con concentraciones de 212 mg/kg de materia seca. Aunque, es importante mencionar que en nuestro trabajo la translocación de Cr fue superior en la parte aérea sin la presencia de HMA, esta no es mayor a la acumulación total de la planta, esto es una buena señal de que los HMA pueden ser explotados con el propósito de la absorción de Cr en la raíz y en el aumento de la tolerancia de la planta a exposición de Cr, lo que coincide con Coelho *et al.* (2017) quienes reportaron que *T.*

erecta exhibió plasticidad en las hojas cuando se expuso a Cr lo que indica un mecanismo de tolerancia a Cr en esta especie.

Es ampliamente conocido que los HMA pueden producir una gran cantidad de micelio externo. También es conocido que la pared celular de este micelio está compuesta mayormente por quitina y que este compuesto estructural provee una eficiente superficie para la absorción de los metales pesados del suelo (Galli *et al.* 1994, González–Chávez *et al.* 2004). Este potencial de adsorción se debe a que las hifas del hongo presentan una mayor afinidad (2 a 4 veces más) que las raíces (Joner *et al.* 2000), por lo que la inoculación de plantas tolerantes con HMA podrían incrementar significativamente la estabilización de metales pesados contenidos en el suelo.

9. CONCLUSIONES

El efecto de la inoculación de los HMA (en el contexto de la fitorremediación) sobre parámetros de crecimiento de las plantas y la absorción de Cr fue positivo, pero varió dependiendo de los hongos micorrízicos y las concentraciones de Cr (VI).

Los HMA contribuyeron a la fitoestabilización del Cr en las raíces de las plantas evitando su traslocación a la parte aérea y potenciando la capacidad de absorción del metal por la planta.

Los HMA le proporcionaron a la planta *T. erecta* protección ante el estrés por presencia de MP Cr. Sin embargo, se evidencia que esta mejora depende de la especie de planta y de la especie de hongo con la que interaccionan, existiendo una compleja dinámica entre las plantas, los hongos micorrízicos arbusculares y el metal en cuestión.

10. LITERATURA CITADA

- Abollino O., Aceto M., Malandrino M., Mentaste E., Sarzanini C. y Barberis R. (2002). Distribution and mobility of metals in contaminated sites. Chemometric Investigation of Pollutant Profiles. *Environ Pollut*, 119(2): 177-93.
- Adki, V. S., J. P. Jadhav, and V. A. Bapat. 2013. *Nopalea cochenillifera*, a potential chromium (VI) hyperaccumulator plant. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 1173-1180
- Adesodun J. K., Atayese M. O., Agbaje T. A., Osadiaye B. A., Mafe O. F., Soretire A. A. (2010). Phytoremediation Potentials of Sunflowers (*Tithonia diversifolia* and *Helianthus annuus*) for Metals in Soils Contaminated with Zinc and Lead Nitrates. *Water, Air, and Soil Pollution*; 207(1):195–201.
- Ahmad F. I., Gerecci D., Gonzalez J. D., Peck J. J., Wax M. K. (2015). The role of postoperative hematoma on free flap compromise. *Laryngoscope*, 125(8):1811–5.
- Ali, S., Chaudhary, A., Rizwan, M., Anwar, H. T., Adrees, M., Farid, M., Irshad, M. K., Hayat, T., Anjum, S.A. (2015). Alleviation of chromium toxicity by glycinebetaine is related to elevated antioxidant enzymes and suppressed chromium uptake and oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 10669-10678.
- Alkorta I, Hernandez-Allica J, Becerril JM, Amezaga I, Albizu I, Garbisu C (2004). Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead and arsenic. *Rev. Environ. Sci. Biotech*, 3: 71-90.
- Alloway, B. J. (1995). *Heavy Metals in Soils* Blackie Academic Professional.
- Alvarado C, Dasgupta-Schubert N, Ambriz E, Sánchez-Yañez J, Villegas J. (2011). Hongos micorrízicos arbusculares y la fitorremediación de plomo. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 27(4) 357-364.
- Arriagada CA, Herrera MA, Ocampo JA (2007) Beneficial effect of saprobe and arbuscular mycorrhizal fungi on growth of *Eucalyptus globulus* co-cultured with Glycine max in soil contaminated with heavy metals. *J Environ Manage* 84, 93-99.
- Audet P (2014) Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Metal Phytoremediation: Ecophysiological Complementarity in Relation to Environmental Stress. In P Ahmad, S Rasool (eds.), *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance Volume II A Sustainable approach*. United State of America: Elsevier-Academic Press, 133-160.
- Aurazo de Zumaeta, M. y Esparza, M. L. (1995). Toxicidad aguda del cromo usando *Allium cepa* L. OPS/CEPIS/95-25(LAB). 23pp.

Azcón R. 2000. Papel de la simbiosis micorrízica y su interacción con otros microorganismos rizosféricos en el crecimiento vegetal y sostenibilidad agrícola. En: Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular. Alarcón A. y FerreraCerrato (eds.). IRENAT-Colegio de Postgraduados, Montecillo. Mundi Prensa, México 251 p.

Barker S., Tagu D. & Delp G. 1998. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* 116, 1201-1207.

Baker, A. M. (1981). Accumulators and excluders: strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* 3, 643-654.

Baker, A. J. M., McGrath, S. P., Reeves, R. y Smith, J. A. C. (2000). Metal Hyperaccumulator Plants: A Review of the Ecology and Physiology of a Biological Resource for Phytoremediation of Metal-Polluted Soils. En: Phytoremediation of Contaminated Soil and Water. (Eds Terry, N. y Bañuelos, G.), 85-107.

Bolán, N., Kunhikrishnan, A., Thangarajan, R, Kumpiene, J., Park, J., Makino, T. Kirkham, M. y Scheckel, K. (2014). Remediation of heavy metal (loid) s contaminated soils-To mobilize or to immobilize. *J. Hazard. Mater.* 266,141-166.

Boonyapookana. B., P. Parkpian, S, Techapinyawat, R.D. DeLaune y A. Jugsujinda. 2006. Phytoaccumulation of Lead by Sunflower (*Helianthus annuus*), Tobacco (*Nicotiana tabacum*), and Vetiver (*Vetiveria zizanioides*). *J Environ Sci.* 40: 117–137.

Banat, K. M., Howari, F. and Al-Hamad, A. A. (2005). Heavy Metals in Urban Soils of Central Jordan: Should we worry about Their Environmental Risks. *Environmental Research*, 97: 258-273.

Barceló J y Poschenrieder C. (2003). Phytoremediation. *Contributions to science*, 2(3), 0333-344.

Borst-Pauwels, G. W. F. H. (1981). Ion transport in yeast. *Biochim Biophys Acta* 650(2-3), 88-127.

Boucher DH, James S, Keeler KH (1982). The ecology of mutualism. *Ann. Rev. Ecol. Sys.* 13: 315-347.

Bosiacki, M. and Wojciechowska, E. 2012. Phytoextraction of nickel by selected ornamental plants. *Ecol. Chem. Eng. S.* 19(3):331-345.

Bosiacki, M. (2009) Phytoextraction of cadmium and lead by selected cultivars of *Tagetes erecta* L. Part II. Contents of Cd and Pb in plants. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* 8, 15–26.

Brooks, R. R., Lee, J., Reeves, R. D. y Jaffré, T. (1977). Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal Geochemical Exploration*, 7: 49-57.

Brooks R. R. (1998). "Plants that hyperaccumulate heavy metals", CAB International Cambridge, USA.

Baker, A. J. M. & R. R. Brooks, 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements- A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, 1: 81- 126.

Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, O., Estrada-Zuñiga, M.E., Barrera-Díaz, C.E., Vernon-Carter, E.J., Sosa-Cruz, F. (2010). Acumulación *in vitro* de plomo y níquel en plántulas de mezquite (*Prosopis laevigata*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 9, 1-9.

Castillo OS, Dasgupta-Schubert N, Alvarado CJ, Zaragoza EM, Villegas HJ (2011) The effects of symbiosis between *Tagetes erecta* L. and *Glomus intraradices* in the uptake of Copper (III) and its implications for Phytoremediation. *New Biotechnol* 29(1):156–164

Cervantes, C., Garcia, J. C., Devars, S., Corona, F. G., Tavera, H. L, Torres-Guzman, J. C., Sanchez, R.M., (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS. Microbiological Reviews*. 25, 335-347.

Chen B, Christie P, Li L. 2001. A Modified Glass Bead Compartment Cultivation System for Studies on Nutrient and Trace Metal Uptake by Arbuscular Mycorrhiza. *Chemosphere* 42: 185-192

Chaney R. L, Li, Y. M., Brown, S. L., Homer, F. A., Malik, M., Angle, J. S., Baker, A. J. M., Reeves, R. D. y Chin, M. (2000). Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems: approaches and progress. En: *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. (eds Terry, N. y Bañuelos, G.), Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.

Christie, P., X. Li. y B. Chen. (2004). Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. *J Plant Soil* 261: 209-217.

Clemens S, Palmgren MG, Krämer U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci* 2002; 7:309-15.

Coelho L C, Bastos A R R, Pinho P J, Souza G A, Carvalho J G, Coelho V A T, Oliveira L C A, Domingues R R, Faquin V. 2017. Marigold (*Tagetes erecta*): The potential value in the phytoremediation of chromium. *Pedosphere*. 27(3): 559– 568.

Cornejo, P., Perez-Tienda, J., Meier, S., Valderas, A., Borie, F., Azcon-Aguilar, C., Ferrol, N. 2013. Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Soil Biology and Biochemistry*, 57: 925-928.

Corradi N. y Charest C. (2011). Some like it toxic. *Molecular Ecology* 20: 3289–3290.

Cuellar-Sanchez A., Gonzalez-Chavez M.C.A., Carrillo-Gonzalez R. 2011. Production of extraradical mycelium and its metal immobilization capacity in the association *Glomus mosseae* BEG25-sorghum. *Revista Latinoamericana El Ambiente y las Ciencias* 1: 1-11.

Cuenca G., Cáceres A., Oirdobro G., Hasmy Z. & Urdaneta C. 2007. Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales. *Interciencia*. 32 (1): 23-29.

De la Rosa, G., Cruz-Jiménez, I. Cano-Rodríguez, R. Fuentes-Ramírez y J. L. Gardea-Torresdey. (2008). Efecto de la edad de la planta y presencia de SS-edds en la tolerancia y absorción de Cr (III) por *Helianthus annuus*. *Rev Mex Ing Quím* 7: 243-251.

Davies, Jr. F. T, Jeffrey, D., Puryear, R. J, Newton J. N., Egilla J. A., Saraiva, G., (2002). Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Physiology*; 158, 777-786.

de Oliveira, L.M., Gress, J., De, J., Rathinasabapathi, B., Marchi, G., Chen, Y., Ma, L.Q. (2016). Sulfate and chromate increased each other's uptake and translocation in As-hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Chemosphere* 147: 36-43.

Diaz G, Azcón-Aguilar C, Honrubia M. Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. *Plant Soil*. 1996; 180(2):241–249.

Duffus, J., (2002). Heavy Metals”A Meaningless Term (IUPAC Technical Report). *Pure. Appl. Chem.* 74 (5), 793–807.

Eleftheriou, E. P., Adamakis, I. D.S., Panteris, E., Fatsiou, M. (2015). Chromium-induced ultrastructural changes and oxidative stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 15852-15871.

Epelde, L.; Becerril, J. M.; Alkorta, I.; Garbisu, C. (2009). Heavy metal phytoremediation: microbial indicators of soil health for the assessment of remediation efficiency. In: Singh, A.; Kuhad, R.C.; Ward O.P. (Eds). *Advances in Applied Bioremediation. Series: Soil Biology* Springer-Verlag. Berlin, Germany, 17, 299-313.

- Ertani A, Mietto A, Borin M, Nardi S (2017) Chromium in agricultural soils and crops: a review. *Water Air Soil Poll* 228:190
- Ferrera-Cerrato, R., A. Alarcón (2008). Biotecnología de los hongos micorrízicos arbusculares. In: A. Díaz, N. Mayek (eds.), *Biofertilización como tecnología sostenible*. Plaza y Valdéz / CONACYT. pp. 25-38.
- Galli U., Schüepp H. y Brunold C. (1994). Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiol. Plantarum*. 926, 364–368.
- Garbisu C, y Alkorta I (2003). Basic concept son heavy metal soil bioremediation. *Eur. J. Min. Process. Environ protection*. 3 (1): 58-66.
- Garbisu C, y Alkorta I (1997). Bioremediation: principles and future. *J. Clean Technol. Environ. Toxicol. Occup. Med*. 6: 1-16.
- García, I. y Dorronsoro, C. (2005). Contaminación por Metales Pesados. En *Tecnología de Suelos*. Universidad de Granada. Departamento de Edafología y Química Agrícola.
- Gardea-Torresdey, J. L., Peralta-Videa, J. R., Montes, M. G., De la Rosa, y Corral-Diaz, B. (2004). Bioaccumulation of cadmium, chromium and copper by *Convolvulus arvensis* L.: impact on plant growth and uptake of nutritional elements. *Bioresource Technology* 92: 229- 235.
- Gaur A, Adholeya A (2004) Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science*. 86: 528-534.
- Gerdeman, J. W. y Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46: 235-244.
- Gill, R.A., Zang, L., Ali, B., Farooq, M.A., Cui, P., Yang, S., Ali, S., Zhou, W., 2015. Chromium-induced physio-chemical and ultrastructural changes in four cultivars of *Brassica napus* L. *Chemosphere* 120, 154–164.
- Ghafoori, M., Majid, N. M, Islam, M. M., Sylvia L. (2011). Bioaccumulation of heavy metals by *Dyera costulata* cultivated in sewage sludge contaminated soil. *Afr J Biotechnol*. 10: 10674-10682
- Göhre, V. y Paszkowski, U. (2006). Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta*. 223, 1115–22.
- Golovatyj, S. E., Bogatyreva E.N., Golovaty S. E. (1999). Effect of levels of chromium content in a soil on its distribution in organs of corn plants. *Soil Res. Fert*. 197-204.

Gonzalez-Guerrero M, Cano C, Azcon-Aguilar C, Ferrol N. (2007). GintMT1 encodes a functional metallothionein in *Glomus intraradices* that responds to oxidative stress. *Mycorrhiza* 17:327-35.

González-Chávez, M. C., Carrillo-González, R., Gutiérrez-Castorena M. C. (2009). Natural attenuation in a slag heap contaminated with cadmium: the role of plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Hazardous Materials*. 161, 1288–1298.

González-Chávez M. C., Carrillo-González R., Wright S. F. y Nichols K. (2004). The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environ. Poll.* 130, 317-323.

Gonzalez-Chavez, M.C., Carrillo-Gonzalez, R. 2013a. Tolerance of *Chrysanthemum maximum* to heavy metals: the potential for its use in the revegetation of tailings heaps. *Journal of Environmental Sciences* 25: 367-375.

Gonzalez-Chavez M.C.A., Carrillo Gonzalez R. 2013b. Enlazando fitorremediación de sitios contaminados y secuestro de carbono como servicio ambiental. IV Simposio Internacional del Carbono en Mexico. 20 - 24 de mayo del 2013. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de Mexico.

González-Chávez, M. C., Ferrera-Cerrato R. y Pérez-Moreno, J. (1998). Biotecnología de la micorriza arbuscular en fruticultura. Colegio de Postgraduados. Montecillo, estado de México.

Gonzalez-Guerrero M, Melville L. H, Ferrol N, Lott J. N. A., Azcon-Aguilar C., Peterson R. L. (2008). Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Canadian Journal of Microbiology*. 54: 103-110.

Gonzalez-Chavez, M.C., Ortega-Larrocea, M.P, Carrillo-Gonzalez, R., Lopez-Meyer, M., Xoconostle-Cazares, B, Gomez S.K., Harrison, M.J., Figueroa-Lopez, A.M., Maldonado-Mendoza, I. E. (2011). Arsenate induces the expression of fungal genes involved in As transport in arbuscular mycorrhiza. *Fungal Biology* 115: 1197-1209.

38. Grubor M. (2008). Lead uptake, tolerance, and accumulation exhibited by the plants *Urtica dioica* and *Sedum spectabile* in contaminated soil without additives. *Archives of Biological Sciences* 60(2):239-244

Hai-Hong Gu, Zheng Zhou, Yu-Qian Gao, Xue-Tao Yuan, Yan-Jun Ai, Jun-Ying Zhang, Wen-Zhe Zuo, Alicia A. Taylor, Shi-Qing Nan y Fu-Ping Li (2017) The influences of arbuscular mycorrhizal fungus on phytostabilization of lead/zinc tailings using four plant species, *International Journal of Phytoremediation*, 19:8, 739-745

Harley, J. L. and Smith, S. E. (1983). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, Toronto.

- Harrison M.J. (1999). Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 361-389.
- Hewitt, E. J, (1953). Metal interrelationships in plant nutrition. I. Effects of some metal toxicities on sugar beet, tomato, oat, potato and marrowstem kale grown in sand culture. *Journal of Experimental Botany.* 4, 59-64.
- Hildebrandt U, Kaldorf M., Bothe H. (1999). The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *J Plant Physiol.* 1999; 154(5):709–717.}
- Jaison S, Muthukumar T. (2017) Chromium accumulation in medicinal plants growing naturally on tannery contaminated and non-contaminated soils. *Biol Trace Elem Res* 175:223–235.
- Joner, E. J., Briones, R., Leyval, C. (2000). Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant Soil* 226, 227–2
- Kaldorf, M., Kuhn, A. J., Schroder, W. H., Hildebrandt, U and Bothe, H, (1999). Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. *J. Plant Physiol.*,154:718–728.
- Khalid S., Shahid M., Niazi N. K., Murtaza B., Bibi I., Dumat C. (2017). A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *J Geochem Explor.*
- Karthik, S., Subramanian, M., Ravikumar, S., y Dhamocharan, R. (2016). Medicinal plants and their uses: A study of twelve sacred groves in Cuddalore and Villupuram districts, Tamil Nadu, India. *The International Educational Research Journal*, 2 (5), 95–102.
- Kirk T.; Cain R., (1996). Biodegradation of Phenols by the Alga *Ochromonas danica*. *Applied and Environmental Microbiology.* 62 (4): 1265-1273.
- Koide RT (1991) Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. *New Phytol.* 117: 365-386.
- Koide RT (1993) Physiology of the mycorrhizal plant. *Adv. Plant Pathol.* 9: 33-54.
- Kumari, V., Yadav, A., Haq, I., Kumar, S., Bharagava, R.N., Singh, S.K., Raj, A., 2016. Genotoxicity evaluation of tannery effluent treated with newly isolated hexavalent chromium reducing *Bacillus cereus*. *J. Environ. Manage* 183, 204-211.
- Lal K., Minhas P. S., Chaturvedi S. R. K., Yadav R. (2008) Extraction of cadmium and tolerance of three annual cut flowers on Cd-contaminated soils. *Bioresource Technol* 99:1006–1011.

- Leigh M, Prouzorá P, Macková M, Nagle D, Fetcher J (2006). Polychlorinated biphenyl (PCB) degrading bacteria associated with trees in a PCB contaminated site. *Appl Environment Microbiology* 72, 2331-2342.
- Leung TLF, Poulin R (2008). Parasitism, commensalism and mutualism: exploring the many shades of symbiosis. *Vie Milieu*. 58: 107-115.
- Leyval, C., Turnau, K., Haselwandter, K (1997). Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza*. 7 (3), 139–153.
- Lin, J., Jiang, W., Liu, D. (2003). Accumulation of copper by roots, hypocotyls, cotyledons and leaves of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Bioresour Technol*. 86, 151-155.
- Ling-Zhi, L., Zong-Qiang, G., Yu-Long, Z., Pei-Jun, L., 2011. Cadmium accumulation and physiology of marigold (*Tagetes erecta* L.) as affected by arbuscular mycorrhizal fungi. *Pedosphere* 21 (3), 319–327.
- Liu, J., Duan, C.-Q., Zhang, X.-H., Zhu, Y.-N., Hu, C., (2009). Subcellular distribution of chromium in accumulating plant *Leersia hexandra* Swartz. *Plant Soil* 322: 187-195.
- Li, T.; Lin, G.; Zhang, X.; Chen, Y. L.; Zhang, S. B.; Chen, B. D. (2014). Relative importance of an arbuscular mycorrhizal fungus (*Rhizophagus intraradices*) and root hairs in plant drought tolerance. *Mycorrhiza*, 24 (8), 595–602.
- Llugany, M.; Lombini, A.; Poschenrieder, Ch.; Dinelli, E.; Barceló, J. (2003). Different mechanisms account for enhanced copper resistance in *Silene armeria* ecotypes from mine spoil and serpentinite sites. *Plant and Soil*. 251:55-63.
- Lucho C, Álvarez M, Beltrán R, Prieto F, y Poggi H (2005). A multivariate analysis of the accumulation and fractionation of major and trace elements in agricultural soils in Hidalgo State, Mexico irrigated with raw wastewater. *Environment International*. 31(3), 313-323.
- Madhavi, V., Kondaiah, P., Subbarayudu, S., Hussain O. M. y Uthanna, S., 2013. “Properties of MoO films by thermal oxidation: Annealing induced phase transition”, *Mater. Express*, (1 3):135p.
- Maldonado M.A., Favela T.E., Rivera C.F. y Volke S.T.L. (2011). Lead bioaccumulation in *Acacia farnesiana* and its effect on lipid peroxidation and glutathione production. *Plant and Soil*. 339, 377-389.
- Marrero J, Díaz A y Coto O (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la Biorremediación. *Revista CENIC* 41(1):67-78.

McGonigle T. P., Miller M. H., Evans D. G., Fairchild G. L., Swan J.A. (1990) A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 115:495–501.

Meier S, Borie F, Bolan N, Cornejo P (2012). Phytoremediation of Metal-Polluted Soils by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *CREST*. 42, 744-775.

Mellem, J. J., Baijnath, H. y Odhav, B. (2012). Bioaccumulation of Cr, Hg, As, Pb, Cu and Ni with the ability for hyperaccumulation by *Amaranthus dubius*,” *African Journal of Agricultural Research*, 7, (4): 591–596.

Murashige T y Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-97.

Nath K, Saini S, Sharma YK (2005) Chromium in tannery industry effluent and its effect on plant metabolism and growth. *J Environ Biol* 26(2):197–204

NOM-021-RECNAT-2000 (2002) Establece las especificaciones de fertilidad, sanidad y clasificación de suelos, estudios, muestreo y análisis.

Olivares, Elizabeth y Peña, Eder. (2009). “Bioconcentración de elementos minerales en *Amaranthus dubius* (bledo, pira), creciendo silvestre en cultivos del estado Miranda, Venezuela, y utilizado en alimentación”. (02 de Marzo de 2013).

Oliveira H (2012) Chromium as an environmental pollutant: insights on induced plant toxicity. *J Bot*, 8.

Ortega-Larrocea M.D.P., Xoconostle-Cazares B., Maldonado-Mendoza I.E., Carrillo-Gonzalez R., Hernández-Hernández J., Garduño M.D., López-Meyer M., Gómez-Flores L., González-Chávez M.C.A. 2010. Plant and fungal biodiversity from metal mine wastes under remediation at Zimapán, Hidalgo, Mexico. *Environmental Pollution* 158: 1922-1931.

Ortiz-Cano H. G., Trejo-Calzada R., Valdez-Cepeda R. D., Arreola-Ávila J. G., Flores Hernández A. y López-Ariza B. (2009). Fitoextracción de plomo y cadmio en suelos contaminados usando quelite (*Amaranthus hybridus* L.) y micorrizas. *Rev. Chap. Ser. Hort.* 15, 161-168.

Oryowska E, Ryszka P, Jurkiewicz A, Turnau K (2005) Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) strains in colonization of plants involved in phytostabilization of zinc wastes. *Geoderma* 129: 92- 98.

Phillips, J. M. y. Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55, 158-161.

- Pineda, R. (2004). Presencia de hongos micorrízicos arbusculares y contribución de *Glomus intraradices* en la absorción y translocación de cinc y cobre en *Helianthus annuus* L. “girasol” crecido en un suelo contaminado con residuos de mina. Tesis de doctorado en Biotecnología. Universidad de ColimaTecomán. Colima, México.
- Pulford, I., Watson, C., McGregor, S., 2001. Uptake of chromium by trees: prospects for phytoremediation. *Environ. Geochem. Health* 23:307-311.
- Rabie, G. H. (2005). Contribution of arbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal–polluted soil. *African Journal Biotechnology*. 4, 332–345.
- Rahami, B.; Nejatkhah, M. P., (2010). Availability, Accumulation and Elimination of Cadmium by *Artemia urmiana* in Different Salinities. *J. Biol. Environ. Sci.* 4, 149-157.
- Rajapaksha, R., Tobor, M. y Baath, E. (2004). Metal toxicity affects fungal and bacterial activities in soil differently. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 2966-2973.
- Rajendran P, Muthukrishnan J y Gunasekaran P (2003). Microbes in heavy metal remediation. *Indian. J. Exp. Biol.* 41:935-944.
- Rajkumar M., Sandhya S., Prasad M. N. V. y Freitas H. (2012). Perspectives of plant associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 30:1562-1574.
- Reale, L., Ferranti, F., Mantilacci, S., Corboli, M., Aversa, S., Landucci, F., Baldisserotto, C., Ferroni, L., Pancaldi, S., Venanzoni, R., 2016. Cyto-histological and morpho physiological responses of common duckweed (*Lemna minor* L.) to chromium. *Chemosphere* 145, 98-105.
- Reeves, R.D. y A.J.M. Baker. 2003. Metal accumulating plants. *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment: John Wiley and Sons Inc., New York, New York, USA, 193-229.*
- Redondo_Gómez, S., E. Mateos-Naranjo, I. Vecino-Bueno, and S. R. Feldman, 2011. *Journal of Hazardous Materials*, 185, 862-869
- Régent Instruments Inc (2013). *WinRHIZO 2013 Reg, User Manual*. Quebec City, QC: Régent Instruments Inc.
- Roane, T. y Pepper, I. (2000). Microorganisms and metal pollution, *Environmental Microbiology* edited by Maier R, Pepper I & Gerba C. Academic press. London New York.
- Robinson, B. H., Chiarucci, A., Brooks, R. R., Petit, D., Kirkman, J. H. y Gregg, P. E. H. (1997). The nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel. *Journal Geochemical Exploration*, 59, 75-86.

Robinson B, Schulin R, Nowack B, Roullet S, Menon M, Clothier B, Green S, Mills T (2006). Phytoremediation for the management of metal flux in contaminated site. *Snow Landsc.Res.* 80, 221-234.

Saadoun, I. y Al-Ghzawi, Z. (2005). Bioremediation of petroleum contamination. *Biorem Aquat Terr Ecosyst.* 173-212.

Sampanpanish P, Pongsapich W, Khaodhian S, Khan E (2006) Chromium removal from soil by phytoremediation with weed plant species in Thailand. *Water Air Soil Pollut* 6:191–206.

Sangwan P, Kumar V, Joshi UN (2014) Effect of chromium(VI) toxicity on enzymes of nitrogen metabolism in cluster bean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.). *Enzym Res.*

Shahid, M., Austruy, A., Echevarria, G., Arshad, M., Sanaullah, M., Aslam, M., Nadeem, M., Nasim, W., Dumat, C., (2014a). EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metals: a review. *Soil Sediment Contam. Int. J.* 23, 389-416.

Shahid, M., Pinelli, E., Dumat, C. (2012e). Review of Pb availability and toxicity to plants in relation with metal speciation; role of synthetic and natural organic ligands. *J. Hazard. Mater.* 219e220, 1e12.

Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M., Pinelli, E. (2014e). Heavy metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 1-44.

Shine AM, Shakya VP, Idnurm A. 2015. Phytochelatin synthase is required for tolerating metal toxicity in a basidiomycete yeast and is a conserved factor involved in metal homeostasis in fungi. *Fungal Biology and Biotechnology* 2: 1-21.

Sharmin S. A., Alam I., Kim K. H., Kim Y. G., Kim P. J., Bahk J. D., et al. (2012). Chromium-induced physiological and proteomic alterations in roots of *Miscanthus sinensis*. *Plant Sci.* 187 113–126.

Singh, P. K.; Singh M.; Agnihotri V.; Vyas D. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi: biocontrol against *Fusarium* wilt of chickpea. *Int. J. Sci. Res. Publ.* 3 (1), 1–5.

Singh S, Srivastava PK, Kumar D, Tripathi DK, Chauhan DK, Prasad SM (2015) Morpho-anatomical and biochemical adapting strategies of maize (*Zea mays* L.) seedlings against lead and chromium stresses. *Biocat Agric Biotech* 4:286–295.

Simona, J., Lupino, P., Antunez, R., Zezzy, M., (2006). Metal Contamination Effects on Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Growth and Protein Expression in Leaves during Development. *J Agricul & Food Chemistry.* 1(54), 8623-8630.

Smith, S. E. y Read, D. J. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.

Soto, C., Gutiérrez, S., Rey-León, A. y González, E. (2010). Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *NOVA* 8(14), 195-205.

Tariq, Saadia R. y Azka Ashraf, (2016). “Comparative evaluation of phytoremediation of metal contaminated soil of firing range by four different plant species.” *Arabian Journal of Chemistry* 9(6):806–814.

Turgut C, Katie Pepe M, Cutright TJ. The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using *Helianthus annuus*. *Environmental Pollution*. 2004; 131 (1):147–54.

UdDin, I., Bano, A., Masood, S., 2015. Chromium toxicity tolerance of *Solanum nigrum* L. and *Parthenium hysterophorus* L. plants with reference to ion pattern, antioxidation activity and root exudation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 271-278.

US Environmental Protection Agency, (1996) Acid digestion of sediments, sludges and soils. In Method 3050b.

Van Assche F y Chysters H, (1990). Effect of metals on enzyme activity in plants. *Plant. Cell. Environ.* 13:195-206.

Vig, K.; Megharaj, M.; Sethunathan, N.; Naidu, R. (2003). Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil. *Environmental Science and Pollution Research*, ISSN: 0944-1344, 8, 121-135.

Volke S. T., Velasco T. J. A., de la Rosa P. D. (2005). *Suelos contaminados por metales pesados y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación*. 1ª edición. Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAT. México, D.F. 120p.

Volke, T. L. y J.A. Velasco. 2002. *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. INE-Semarnat, México. 64 p.

Wang Y., Huang J., Gao Y. (2012) Arbuscular mycorrhizal colonization alters subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Medicago sativa* L. and resists cadmium toxicity. *PLoS One.*; 7(11):e 48669.

Wuana, RA y Okieimen FE (2011). Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecol Article*.

- Wu, F. Y., Bi, Y. L., Leung, H. M., Yec, Z. H., Lin, X. G., Wong, M. H. (2010). Accumulation of As, Pb, Zn, Cd and Cu and arbuscular mycorrhizal status in populations of *Cynodon dactylon* grown on metal-contaminated soils. *Applied Soil Ecology* 44, 213–218.
- Wu, S. L., Chen, B. D., Sun, Y. Q., Ren, B. H., Zhang, X., y Wang, Y. S. (2014). Chromium resistance of dandelion (*Taraxacum platyepidum* Diels.) and bermudagrass (*Cynodon dactylon* [Linn.] Pers.) is enhanced by arbuscular mycorrhiza in Cr (VI)-contaminated soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(9), 2105-2113.
- Wyszkowski M, Radziemska M. (2010). Effects of chromium (III and VI) on spring barley and mayze biomass yield and content of nitrogen compounds. *Journal of Toxicology and Environment Health, Part A*;73 (17):1274–1282.
- Wyszkowski M, Radziemska M. (2013). Influence of chromium (III) and (VI) on the concentration of mineral elements in oats (*Avena sativa* L.) *Fresenius Environmental Bulletin.* ;22(4):979–986.
- Yang, Y., Han, X., Liang, Y., Ghosh, A., Chen, J., and Tang, M. (2015). The combined effects of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and lead (Pb) stress on Pb accumulation, plant growth parameters, photosynthesis, and antioxidant enzymes in *Robinia pseudoacacia* L. *PLoS ONE* 10:e0145726.
- Zhang, X. H., Liu, J., Huang, H. T., Chen, J., Nian, Z. Y., Wang, D. Q., 2007. Chromium accumulation by the hyperaccumulator plant *Leersia hexandra* Swartz. *Chemosphere* 67: 1138–1143.
- Yang, Y., Liang, Y., Han, X., Chiu, T.Y., Ghosh, A., Chen, H., Tang, M., 2016. The roles of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in phytoremediation and tree-herb interactions in Pb contaminated soil. *Sci. Rep.* 6, 20469.
- Zhang, X. H., J. Liu, H. T. Huang, J. Chen, Y. N. Zhu, and D. Q. Wang. 2007. Chromium accumulation by the hyperaccumulator plant *Leersia hexandra*. *Chemosphere* 67: 1138-1143.
- Zayed, A.M.; Terry, N. (2003). Chromium in the environment: Factors affecting biological remediation. *Plant Soil*, 249, 139–156.
- Zou L., Liu P. y Li X. (2013). New advances in molecular mechanism of microbial hexavalent chromium reduction. *Journal of Biotechnology and Food Science* 1: 46-55.