



**EFFECTO DE LA EDAD DE LA PLANTA Y PRESENCIA DE SS-EDDS EN LA TOLERANCIA Y ABSORCIÓN DE Cr(III) POR *Helianthus annuus***

**EFFECT OF THE PLANT STAGE AND PRESENCE OF A CHELATING AGENT ON THE TOLERANCE AND ABSORPTION OF Cr(III) BY *Helianthus annuus***

G. de la Rosa<sup>1\*</sup>, G. Cruz-Jiménez<sup>1</sup>, I. Cano-Rodríguez<sup>1</sup>,  
R. Fuentes-Ramírez<sup>1</sup> y J. L. Gardea-Torresdey<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Química, Universidad de Guanajuato. Col. N. Alta s/n C.P. 36050, Guanajuato, Gto., Mexico

<sup>2</sup> Chemistry Department and Environmental Science and Engineering Ph.D. Program,  
The University of Texas at El Paso, El Paso, TX. 79968, USA.

Recibido 15 de Julio 2008; Aceptado 24 de Octubre 2008

**Resumen**

Se realizaron experimentos en hidroponía para determinar el efecto de Cr(III) en la germinación de girasol (*H. annuus*, variedad enana) y la tolerancia y absorción de este metal en presencia y ausencia del quelante SS-etilendiamino disuccinato de sodio (SS-EDDS). Se determinó que 40 mg Cr(III) L<sup>-1</sup> no afectan significativamente la germinación. Adicionalmente se observó que a menor edad de las plántulas, éstas presentaron mayor tolerancia al Cr(III). Más aún, si las semillas se germinan directamente en las soluciones que contienen Cr(III), el girasol tolera mejor la exposición al metal. Posteriormente, con el objeto de determinar la capacidad de absorción del metal, crecimiento de la planta y producción de clorofila, se germinaron y crecieron las plántulas en: (a) solución nutritiva sin Cr(III) (Control I); (b) solución nutritiva sin Cr(III) + 0.8 mM EDDS (Control II); (c) solución nutritiva con 40 mg L<sup>-1</sup> Cr(III); (d) solución nutritiva con 40 mg L<sup>-1</sup> Cr(III) + 0.8 mM EDDS. Las plántulas se cosecharon cada tres días y por quince días a partir de la germinación con el fin de determinar la absorción de Cr(III) con respecto al tiempo. Se encontró que después de 15 días las raíces acumularon 7,400 y 710 mg Cr kg<sup>-1</sup>, mientras que en el tallo, la acumulación fue de 200 y 32 mg Cr kg<sup>-1</sup> (peso seco), para los tratamientos con Cr(III) y Cr(III)-SS-EDDS, respectivamente. Por lo tanto, la presencia del SS-EDDS reduce la absorción y traslocación de Cr(III). Los datos indican que si se pretende utilizar *H. annuus* var. enana para la fitorremediación de Cr(III), es adecuado sembrar directamente en el medio contaminado y además no se requiere la presencia del SS-EDDS. Estas características son importantes ya que se pueden reducir los costos asociados a la fitorremediación de sitios contaminados con Cr(III) utilizando esta especie vegetal.

*Palabras clave:* fitorremediación, Cr(III), EDDS, edad de la planta, traslocación.

**Abstract**

Experiments were performed in hydroponics to determine the effect of Cr(III) on *H. annuus* germination, tolerance, and absorption in the presence and absence of the chelating agent SS-ethylene diamine tetraacetate (SS-EDDS). The presence of 40 mg kg<sup>-1</sup> Cr(III) had no significant effect on seed germination. In addition, seeds and seedlings at different growth stages were treated with 40 mg kg<sup>-1</sup> Cr(III) to determine the effect of plant age on the tolerance to these treatments. It was found that the younger the plant, the higher the resistance to Cr(III). Consequently, *H. annuus* seeds were sown on (a) nutrient solution without Cr(III) (Control I); (b) nutrient solution without Cr(III) + 0.8 mM EDDS (Control II); (c) nutrient solution with 40 mg L<sup>-1</sup> Cr(III); (d) nutrient solution with 40 mg L<sup>-1</sup> Cr(III) + 0.8 mM EDDS. It was found that, after 15 days following germination, roots were able to accumulate 7,400 y 710 mg Cr kg<sup>-1</sup>, whereas shoots accumulated 200 y 32 mg Cr kg<sup>-1</sup> (dry weight), for Cr y Cr- SS-EDDS treatments, respectively. Therefore, the presence of SS-EDDS reduced Cr(III) absorption and traslocation. These results indicated that *H. annuus* does not need the presence of SS-EDDS to absorb significant amounts of Cr(III); this might reduced the costs associated to the phytoremediation of Cr(III) contaminated media using this plant species.

*Keywords:* phytoremediation, Cr(III), EEDS, plant age, traslocation.

\* Autor para la correspondencia. E-mail: delarosa@quijote.ugto.mx

## 1. Introducción

El cromo es un metal que se utiliza ampliamente en la industria, incluyendo la curtiduría, el cromado, producción de pigmentos y pinturas y en la conservación de la madera, entre otros. Dichas actividades han incrementado enormemente los niveles de este metal en el medio ambiente lo que representa un peligro potencial para la salud. El cromo se presenta principalmente en dos estados de oxidación, el trivalente (Cr(III)) y el hexavalente (Cr(VI)), de los cuales el último es el más tóxico. Esto no demerita la toxicidad del Cr(III) que, en grandes concentraciones, puede provocar diversos problemas en organismos vivos. Algunos estudios sugieren que esta especie de Cr puede tener un efecto adverso en el metabolismo de hierro en humanos (Kornhauser y col., 2002). Por otro lado, dependiendo de las condiciones ambientales, el Cr(III) puede ser oxidado a Cr(VI) lo que implica un aumento en su toxicidad. Se sabe que en la región centro de México existe una elevada contaminación por cromo, tanto en aguas subterráneas como en suelos, lo que se debe tanto a fuentes naturales como antropogénicas (Robles-Camacho y Armienta, 2000). Específicamente, en las ciudades de León y San Francisco del Rincón, Gto., existen alrededor de 650 tenerías en cuyo efluente se pueden encontrar concentraciones entre 3 y 10 g L<sup>-1</sup> de Cr total (Alvarez y col., 2004). Esta fuerte contaminación representa un peligro potencial para los habitantes del área por lo que es importante tomar medidas precautorias así como de remediación.

La capacidad de las plantas para “purificar” ambientes ha sido reconocida desde tiempos antiguos. Sin embargo, es hasta los años 90 que la técnica llamada “fitorremediación” surge como una alternativa nueva para la limpieza de medios contaminados (Barceló y Poschenrieder, 2003), y por ello actualmente existe un incremento considerable en las investigaciones realizadas en este campo. Entre las ventajas que muestra esta técnica en comparación con las llamadas tradicionales, se encuentra su bajo costo, la aplicabilidad en grandes áreas y la nula o poca agresividad hacia el medio ambiente. Tan promisorio y viable es esta tecnología, que en varios países del mundo ya se aplica como un complemento para la remediación de la contaminación (Gardea-Torresdey y col., 2005; USEPA, 2005).

En el campo de la fitorremediación, una de las tareas principales para los investigadores es la identificación de plantas hiperacumuladoras, es decir, aquellas con la habilidad de absorber y acumular grandes cantidades de contaminantes en la biomasa aérea. En cuanto a cromo se refiere, una planta se considera hiperacumuladora si es capaz de acumular hasta 1000 mg kg<sup>-1</sup> de peso seco en la parte aérea (Brooks, 1998). El girasol (*Helianthus annuus*) ha sido identificado como una planta

potencialmente hiperacumuladora de Cr, sin embargo es también muy sensible a este metal mostrando signos de fitotoxicidad a ciertas concentraciones. En general se ha reportado que en plantas de interés agronómico, el Cr es tóxico en concentraciones que van de los 0.5 a los 5.0 µg mL<sup>-1</sup> en solución nutritiva (Hossner, 1996).

Por otro lado, se ha demostrado que esta planta tolera y acumula otros metales incluyendo algunos elementos radioactivos y se ha trabajado ya incluso en experimentos piloto para remediar algunos sitios con problemas de contaminación.

Una de las estrategias que se han utilizado para incrementar la absorción de metales por plantas no hiperacumuladoras es la adición de quelantes al medio de crecimiento con el fin de aumentar su biodisponibilidad (fitodisponibilidad). Por otro lado, los quelantes reducen en algunas ocasiones la fitotoxicidad de metales, efecto que se observó en *Salsola kali* tratada con Pb en presencia y ausencia de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (De la Rosa y col., 2007).

El objetivo de la presente investigación fue determinar si, en *H. annuus* var. enana, la edad de la planta está relacionada con la tolerancia a Cr(III), así como explorar el efecto del quelante SS-EDDS en: (a) la tolerancia y acumulación de Cr(III) y (b) en los factores de bioacumulación. Se seleccionó el SS-EDDS debido a que es un compuesto que se produce naturalmente por algunos microorganismos y es biodegradable (Meers y col., 2005). El medio de hidroponía se eligió ya que proporciona un buen modelo para estudiar las respuestas de los organismos en un tiempo relativamente corto (De la Rosa, 2005). Es importante mencionar que existen pocos estudios sobre el efecto de la edad de la planta en la tolerancia a contaminantes, información que es de suma importancia en la toma de decisiones sobre la aplicación de las técnicas de la fitorremediación.

## 2. Metodología

### 2.1 Preparación de medio nutritivo y soluciones de cromo

El medio nutritivo que se empleó fue la solución de Hoagland modificada por Peralta y col., (2001). A continuación se detalla la composición del medio: Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (0.35 mM); CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (2.1 mM); Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.91 mM); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.97 mM); KNO<sub>3</sub> (0.255 mM) H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (23.13 µM); MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (3.9 µM); MoO<sub>3</sub> (23.13 µM); CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.44 µM); Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O (10 µM); y Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.37 µM). Una solución stock de 1000 mg L<sup>-1</sup> de Cr(III) se preparó a partir de Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. Se realizaron diluciones con dicha solución para obtener concentraciones de 0, 5, 10, 20, 40 y 80 mg L<sup>-1</sup> Cr(III) utilizando la solución nutritiva de Hoagland. Cuando el experimento lo requirió se agregó al medio la cantidad necesaria del quelante SS-EDDS

para obtener una concentración de 0.8 mM y en todos los casos el pH del medio se ajustó a 4.8.

### 2.2 Determinación del efecto de Cr(III) en la germinación de *Helianthus annuus*

Veinte semillas de girasol por réplica por tratamiento se desinfectaron por 30 min con hipoclorito de sodio al 5% y después de enjuagarlas con agua desionizada, se colocaron en cajas Petri sobre papel humedecido con solución nutritiva conteniendo diferentes concentraciones del metal (0, 5, 10, 20, 40, 80 mg L<sup>-1</sup>), de acuerdo a lo descrito por Carrillo-Castañeda y col. (2002). Se realizaron observaciones diarias y se registró el tiempo de germinación en cada uno de los tratamientos. Para efectos de este proyecto, se consideró que una semilla germinó si emitió una radícula de al menos 2 mm de longitud. Con el fin de eliminar errores debidos a la viabilidad de las semillas, se determinaron los porcentajes de germinación relativa, esto es, la germinación de las plantas en los tratamientos con respecto a la germinación de las semillas control. Una vez analizados los resultados de germinación se determinó que, bajo las concentraciones ensayadas, 40 mg L<sup>-1</sup> fue la máxima concentración de Cr(III) a la cual no se observa un decremento en el porcentaje de germinación. Esta concentración sirvió de referencia para realizar los experimentos posteriores.

### 2.3 Efecto de la edad de la planta en la tolerancia a Cr(III)

En este experimento, tanto semillas como plántulas de girasol de diferentes edades (4, 8, 16 y 20 días después de la germinación) se expusieron a una concentración de 40 mg L<sup>-1</sup> Cr. Como al momento no existe información que pueda indicar una relación edad-tolerancia en girasol, se seleccionaron estas edades para tener un punto de comparación con alfalfa, en donde sí se tienen datos acerca de la tolerancia a Cr a diferentes edades de la planta (Peralta-Videa y col., 2004). Las plantas provenientes de semillas que se germinaron directamente en el tratamiento con Cr(III) se cosecharon al día 15. Sin embargo, el periodo de exposición de las plantas de 4, 8, 16 y 20 días de edad dependió del tiempo al cual se comenzaron a observar signos de fitotoxicidad (i.e. reducción en la producción de clorofila, reducción de crecimiento de raíz y tallo, pérdida de turgencia en hojas). El contenido de clorofila se evaluó utilizando un medidor de clorofila Minolta SPAD 502. Para fines estadísticos, se muestrearon al menos 10 plantas por réplica por tratamiento (cada tratamiento contenía tres réplicas).

### 2.4 Efecto del quelante SS-EDDS sobre la absorción y tolerancia de *H. annuus* a Cr(III)

Aun cuando existen datos que indican que el girasol es un hiperacumulador potencial de Cr (Davies y col., 2002), se sabe que también es poco tolerante a este metal. En estudios realizados con *Salsola kali* en presencia de Pb(II), se encontró que los efectos fitotóxicos del metal se redujeron con la adición de EDTA (De la Rosa y col., 2007). Con base en lo anterior, es posible que la presencia del SS-EDDS en el medio de crecimiento disminuya los efectos fitotóxicos del Cr(III) en *H. annuus*. Para confirmar dicha hipótesis, el girasol se expuso desde la germinación a los siguientes tratamientos: (a) solución nutritiva sin Cr(III) (Control I); (b) solución nutritiva sin Cr(III) + EDDS 0.8 mM (Control II); (c) solución nutritiva con 40 mg L<sup>-1</sup> Cr(III); (d) solución nutritiva con 40 mg L<sup>-1</sup> Cr(III) + EDDS 0.8 mM. Las plantas se expusieron a los tratamientos por 15 días y se tomaron muestras cada tres días con el fin de obtener plántulas para determinar la absorción de Cr(III) por *H. annuus* con respecto al tiempo. En las plántulas muestreadas se llevaron a cabo mediciones de tamaño de raíz (del ápice principal de la raíz hasta la corona) y tallo (de la corona hasta el ápice principal del tallo) así como del contenido de clorofila. Se cuantificó el contenido de Cr total así como de macro y micronutrientes en los tejidos vegetales.

### 2.5 Determinación del contenido de Cr, macro y micronutrientes en tejidos de *Helianthus annuus*

Las plántulas obtenidas de los ensayos se separaron en parte subterránea y parte aérea y se secaron en una estufa a 80 °C por 72 h. Una vez deshidratadas, las muestras se molieron y se pasaron por un tamiz del No. 20. Posteriormente, 0.1 g de muestra se colocaron en tubos hatch, a los que se agregaron 6 mL de HNO<sub>3</sub> grado traza y se llevaron a digestión utilizando un digestor de placa a una temperatura de 105°C por 3 h. La cuantificación del contenido de Cr se realizó mediante espectroscopia de absorción atómica en un Espectrómetro Perkin Elmer AANALYST-100, mientras que la medición del contenido de algunos macro y micronutrientes (Ca, K, Mg, P, S, Mn, Mo, Cu, Fe, Zn) se realizó mediante la espectroscopia por plasma acoplado inductivamente (ICP/OES), Perkin Elmer Optima 4500 DV.

### 2.6 Determinación de los factores de acumulación

Con la información del contenido de cromo en los tejidos de la planta se calculó: (a) el factor de bioconcentración en raíz (FBR), que indica la concentración del contaminante en raíces con respecto a la concentración del contaminante en el medio de crecimiento y (b) el factor de

bioconcentración en tallo (FBT), que relaciona la concentración del metal en tallos con la concentración del metal en el medio de crecimiento (Máthé-Gáspár y Antón, 2005; Yoon y col., 2006). Estos datos dan una idea general de la eficiencia de la planta para absorber y transportar el metal del medio de crecimiento a la parte aérea que es la que usualmente se cosecha. Los factores se obtuvieron a partir de las ecs. (1) y (2)

$$FBR = \frac{\text{concentración de metal en la raíz}}{\text{concentración de metal en la solución}} \quad (1)$$

$$[=] \frac{mg/kg}{mg/kg}$$

$$FBT = \frac{\text{concentración de metal en los tallos}}{\text{concentración de metal en la solución}} \quad (2)$$

$$[=] \frac{mg/kg}{mg/kg}$$

### 2.7 Absorción de Cr(III) por *Helianthus annuus* en ausencia y presencia de quelante como función del tiempo

Las plántulas expuestas al Cr(III) en ausencia y presencia del quelante se cosecharon cada tres días y por quince días a partir de la germinación y se cuantificó el contenido de Cr en los tejidos. Estos datos se utilizaron para analizar la variación en el contenido de Cr con respecto al tiempo mediante estimaciones de curva utilizando el software SPSS 12.0.

### 2.8 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete SPSS versión 12.0. Las diferencias significativas para más de dos medias se calcularon mediante un ANOVA seguido de una prueba de Tukey (HSD). Las diferencias significativas para dos medias se determinaron mediante la prueba t. Para validez estadística, se realizaron tres réplicas por tratamiento con al menos 15 plantas por tratamiento. Al término de los experimentos se muestrearon 10 plantas por réplica. Mediante análisis estadístico se determinó si el EDDS tiene algún efecto en la absorción de Cr por la planta de girasol y si disminuye el efecto fitotóxico del Cr en esta especie vegetal.

## 3. Resultados y discusión

### 3.1 Efecto del Cr(III) en la germinación de *Helianthus annuus*.

El efecto tóxico de contaminantes sobre la germinación de semillas es un buen indicativo de la posible tolerancia de la planta (Carrillo-Castañeda y col., 2002), por ello es importante obtener datos acerca del efecto de Cr en dicho proceso. Los resultados indicaron que la germinación de *H.*

*annuus* no se afectó significativamente, con respecto al control sin metal, en concentraciones de 40 mg Cr(III) L<sup>-1</sup> o menos. En general, las semillas de algunas plantas permanecen quiescentes, esto es, permanecen vivas sin permitir cambios metabólicos que induzcan al crecimiento del embrión. Cuando las condiciones de temperatura y humedad son las adecuadas, la germinación se promueve (Salisbury y Parke, 1954). Este proceso comienza con la imbibición, es decir la absorción de agua, y se completa cuando el eje del embrión comienza a elongarse (Crawford y col., 2000). La movilización de las reservas se lleva a cabo y se promueve entonces el crecimiento de la planta. En los resultados presentados en este trabajo, concentraciones de 80 mg Cr(III) L<sup>-1</sup> afectaron la germinación del girasol, disminuyendo un 25% con respecto al control sin Cr(III), lo que puede significar que la movilización de las reservas fue afectada por la presencia de Cr(III) en dicha concentración, y por lo tanto el embrión no creció. Estudios bioquímicos podrían aportar información importante para elucidar este mecanismo. Con base en estos resultados se eligió la concentración de 40 mg Cr(III) L<sup>-1</sup> para los experimentos posteriores.

### 3.2 Efecto de la edad de la planta en la tolerancia a Cr(III)

Para evaluar el efecto de la edad de la planta en la tolerancia a Cr(III), en este experimento, semillas y plántulas de girasol a la edad de 4, 8, 16 y 20 días se expusieron a 40 mg Cr(III) L<sup>-1</sup> en medio de hidroponía. Las plántulas se cosecharon en el día en el que se comenzaron a observar signos de fitotoxicidad. La Tabla 1 indica la edad a la que las plántulas se expusieron al tratamiento de Cr(III), el día de cosecha y el contenido de clorofila.

Tabla 1. Efecto de la edad de *H. annuus* en la tolerancia a la exposición a 40 mg Cr(III) L<sup>-1</sup>.

Edad*	Días**	Clorofila (SPAD)
0 (semilla)	15***	56.5 ± 1 <sub>a</sub>
4	10	60 ± 5 <sub>a</sub>
8	8	30 ± 6 <sub>b</sub>
16	5	20 ± 5 <sub>c</sub>
20	5	20 ± 5 <sub>c</sub>

\*Edad se refiere a los días después de la germinación

\*\*Días se refiere a los días que las plantas toleraron el tratamiento antes de presentar signos de fitotoxicidad.

\*\*\* No se observaron signos de fitotoxicidad

Diferentes letras indican diferencias significativas (P<0.05)

Los resultados muestran que plantas con 16 y 20 días de edad toleraron el tratamiento de 40 mg Cr(III) L<sup>-1</sup> únicamente por 5 días, al término de los cuales se observó pérdida de turgencia de raíces y tallos, una lectura de clorofila significativamente menor en

comparación con las plantas de 4 y 8 días de edad e incluso muerte en algunas de ellas.

Las plantas con 8 días de edad resistieron el Cr por 8 días. La disminución de la producción de clorofila se observó inicialmente como reducción del color verde de las hojas y también se observó pérdida de turgencia en los tejidos. Finalmente, las plantas de edad de 4, resistieron 10 días de exposición al Cr pero se observó el comienzo de la toxicidad como pérdida de turgencia. Adicionalmente se observó que, cuando el girasol se expone a los tratamientos de Cr desde el estado de semilla, la resistencia es aún mayor. En este último caso, después de 15 días de tratamiento con el Cr(III) las plantas parecían visiblemente saludables. En el caso de alfalfa, se ha observado que a mayor edad de las plantas, mayor tolerancia a Cd(II), Cu(II) y Zn(II) (Peralta y col., 2004). Silva-Gonzaga y col (2007), estudiando *Pteris vitata* a diferentes edades encontraron que plantas más jóvenes son más aptas para la remoción de arsénico. En el caso del girasol se obtuvo una correlación negativa para el análisis de tolerancia con respecto a la edad de la planta (coeficiente de correlación de Pearson de  $-0.933$  a  $P < 0.01$ ), lo que indica que a mayor edad, menor tolerancia al Cr(III). De acuerdo a este hallazgo, en los siguientes experimentos se expuso el girasol a los tratamientos de Cr(III) con y sin quelante desde el estado de semilla.

Estos resultados muestran que el girasol presenta la ventaja potencial de que puede sembrarse directamente en el sitio contaminado, lo que reduciría los tiempos empleados en la fitorremediación.

### 3.3 Efecto de la presencia de SS-EDDS sobre la tolerancia de *Helianthus annuus* a Cr(III).

En las figs. 1 y 2 se muestran los resultados obtenidos para la elongación de raíces y tallos, respectivamente. De acuerdo con los resultados obtenidos, no se observó una reducción significativa ( $P < 0.05$ ) en el tamaño de la raíz de las plantas tratadas con Cr(III) en relación a las plantas control (Figura 1). Sin embargo, se observó que del día 9 al día 15, el crecimiento de las raíces del tratamiento Cr(III)- SS-EDDS tiende a ser mayor que el de aquellas tratadas únicamente con Cr(III). Adicionalmente, es claro que en el día 15, las raíces de plantas tratadas con Cr(III)- SS-EDDS tuvieron una elongación significativamente mayor ( $11 \pm 0.4$  cm) ( $P < 0.05$ ) que aquellas tratadas únicamente con Cr(III) ( $9 \pm 0.4$  cm). Los tallos de las plantas control con y sin EDDS crecieron de forma exponencial durante los primeros 3 días de tratamiento, cuando alcanzaron longitudes de  $10.4 \pm 0.34$  cm y  $11.2 \pm 0.5$  cm, respectivamente. Estos valores se mantuvieron prácticamente constantes durante el resto del tratamiento. Se ha reportado que cuando las plantas se someten a un ambiente controlado, éstas crecen de forma exponencial mientras logran mantener una

composición química constante, pero dicho crecimiento declina cuando se reduce la disponibilidad de nutrientes, principalmente el nitrógeno (Seginer, 2004). Es posible que esta sea la causa de la reducción de la velocidad de crecimiento de las plantas. Por lo tanto, es posible que si se renuevan las soluciones nutritivas cada 3 días, las plantas en estos experimentos puedan continuar desarrollándose.

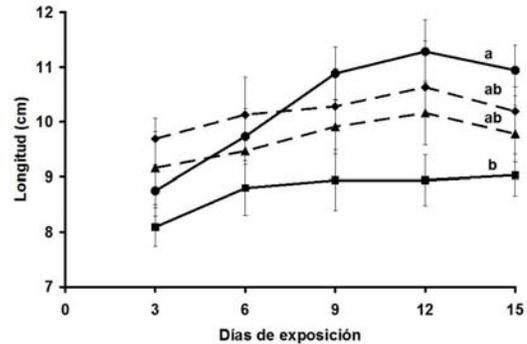


Fig. 1. Longitud de raíz de *Helianthus annuus* en (a) Control I (---◆---); (b) Control II (---▲---); (c)  $40 \text{ mg L}^{-1}$  Cr(III) (—■—); (d)  $40 \text{ mg L}^{-1}$  Cr(III) + SS-EDDS (—●—). Diferentes letras en el último día de cosecha indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Las barras de error corresponden al error estándar.

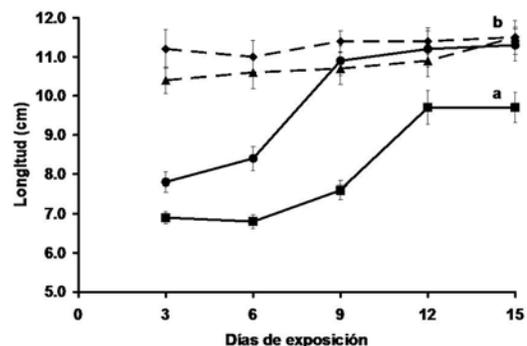


Fig. 2. Longitud de tallos de *H. annuus* en (a) Control I (---◆---); (b) Control II (---▲---); (c)  $40 \text{ mg L}^{-1}$  Cr(III) (—■—); (d)  $40 \text{ mg L}^{-1}$  Cr(III) + SS-EDDS (—●—). Diferentes letras en el último día de cosecha indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Las barras de error corresponden al error estándar.

Adicionalmente se observó que después de 15 días de tratamiento, en las plantas control el crecimiento fue aproximadamente de  $11.5 \pm 0.2$  cm, mientras que en las plantas tratadas con Cr(III), este tamaño disminuyó a  $9.7 \pm 0.4$  cm. La reducción del crecimiento de raíz y tallo en plantas tratadas con Cr(III) en comparación con las plantas expuestas al Cr(III)- SS-EDDS fue de aproximadamente el 15%. Resultados similares se han obtenido cuando plantas de *Salsola kali* se crecieron en Pb en ausencia y presencia de EDTA como acomplejante (De la Rosa y col., 2007). En ambos casos se observó que en los

tratamientos con metal, el crecimiento de tallos y raíces fue significativamente mayor cuando el quelante se encontró presente, en comparación con las plantas sin EDTA. Además de *Salsola*, otras especies vegetales como *Pisum sativum* han presentado un comportamiento similar (Piechalack y col., 2003). La producción de biomasa no se vio significativamente afectada ni en raíz ( $3.3 \pm 1.0$  mg/planta) ni en tallo ( $9.2 \pm 1.4$  mg/planta), lo que favorece el uso potencial de esta planta con fines de fitorremediación.

Los datos de producción de clorofila (Tabla 2) indicaron que durante los 3 primeros días de contacto con el Cr, éste podría inducir la producción de este pigmento vegetal. Sin embargo, al final del experimento, se observó una reducción significativa con respecto a la clorofila en las plantas control (I). Los coeficientes de correlación de Pearson indicaron una correlación negativa ( $P < 0.01$ ) para el tiempo de exposición y producción de clorofila en las plantas de los tratamientos con Cr(III) ( $r = -0.582$ ) y Cr(III)-SS-EDDS ( $r = -0.457$ ). Esto puede indicar que, conforme pasa el tiempo, el Cr podría estar afectando la producción del pigmento aún cuando de forma general no se presentaron signos visuales agresivos en las plantas. La producción de clorofila comienza a partir del ácido glutámico, pasando por una serie de reacciones para obtener el ácido 5-aminolevulínico, el porfobilinógeno y la protoporfirina, entre otros, hasta llegar a la clorofila (Taiz y Zeiger, 1998). Las moléculas intermediarias contienen grupos funcionales que incluyen ácidos carboxílicos y aminas, es posible que la presencia de Cr induzca la formación de complejos inactivando los compuestos necesarios para las reacciones subsiguientes. Más específicamente, se ha reportado que en algunas especies fotosintéticas como las algas, el cromo (Mallick y Mohn, 2003) afecta especialmente este sistema.

Tabla 2. Contenido de clorofila en hojas de plantas control y plantas tratadas con  $40 \text{ mg Cr(III) L}^{-1}$  y  $40 \text{ mg Cr(III) L}^{-1}$ -SS-EDDS a los de 3 y 15 días de tratamiento.

Tratamiento	Clorofila (SPAD)	
	Día 3	Día 15
Control (I)	$57.3 \pm 1.0_{bc}$	$58.3 \pm 1.0_a$
Control (II)	$51.0 \pm 3.0_c$	$53.0 \pm 1.0_{ab}$
$40 \text{ mg L}^{-1}$ Cr(III)	$68 \pm 1.0_a$	$56.0 \pm 1.0_b$
$40 \text{ mg L}^{-1}$ Cr(III)+SS-EDDS	$60.0 \pm 1.0_b$	$53.0 \pm 1.0_b$

\*Valores en unidades SPAD (Soil Plant Analytical Division).

Diferentes letras indican si existen diferencias significativas entre los datos de la misma columna. Los datos representan el promedio de 30 muestras (10 plantas por réplica con tres réplicas por tratamiento)  $\pm$  Error Estándar.

Para complementar esta información se requieren estudios bioquímicos con el fin de identificar los

mecanismos exactos mediante los cuales el cromo afecta la producción de clorofila o su degradación.

### 3.4 Absorción de Cr(III) por *Helianthus annuus*

#### 3.4.1 Absorción de Cr(III) en presencia y ausencia de quelante

Las figs. 3 y 4 presentan el contenido de Cr en raíces y tallos, respectivamente, para *H. annuus* expuesto a tratamientos con Cr(III) y Cr(III)-SS-EDDS. Se observó que tanto en raíz como en tallo, la presencia del quelante provocó una disminución del contenido de Cr. Resultados similares se han observado en *S. kali* cuando ha sido expuesta a tratamientos con Pb y Pb-EDTA (De la Rosa y col., 2007). En este caso la presencia del quelante EDTA disminuyó significativamente el contenido de Pb en raíces y tallos de *S. kali* tratadas con Pb-EDTA, en comparación con los tratamientos de Pb (De la Rosa y col., 2007). De la misma forma, January y col. (2008) reportan la reducción en la absorción de Cr, cuando plantas de girasol variedad Sundance fueron expuestas a soluciones multimetales en presencia de EDTA.

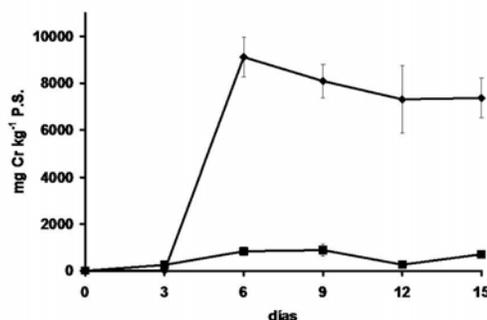


Fig. 3. Contenido de Cr en raíces de *H. annuus* en (a)  $40 \text{ mg L}^{-1}$  Cr (III) (—♦—) y (b)  $40 \text{ mg L}^{-1}$  Cr(III) + SS-EDDS (—■—). Las barras de error corresponden al error estándar.

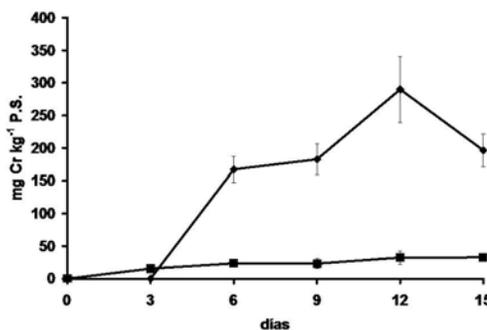


Fig. 4. Contenido de Cr en tallos de *H. annuus* en (a)  $40 \text{ mg L}^{-1}$  Cr (III) (—♦—) y (b)  $40 \text{ mg L}^{-1}$  Cr(III) + SS-EDDS (—■—). Las barras de error corresponden al error estándar.

Es importante mencionar que el EDTA es un compuesto que muestra una baja biodegradabilidad

(Bucheli-Witschel y Egli, 2001) y alta movilidad por lo que se ha detectado en una gran variedad de aguas naturales (Nowack y VanBriesen, 2005). Por esta razón, en la presente investigación el compuesto de elección fue el SS-EDDS.

Meers y col. (2007) realizaron experimentos con SS-EDDS para identificar su efecto en la absorción de varios metales -entre ellos Cr- por *S.dasyclados* 'Loden'. Este grupo observó que, mientras que la absorción de Cd y Zn se incrementó de un 50 a un 100%, la absorción de Cr en presencia del EDDS no varió significativamente. Por otro lado, Tandy y col. (2006) reportan la reducción en la absorción de Cu y Zn por plantas de girasol variedad Iregi tratadas con EDDS, mientras que la absorción de Pb sí se incrementó. Adicionalmente, Beijian y col. (2002) emplearon *H. annuus* variedad híbrido 571, aproximadamente a las mismas concentraciones de Cr(III) utilizadas en el presente trabajo. Si bien, las concentraciones de Cr que se reportan para el híbrido 571 (14 000 y 680 mg kg<sup>-1</sup> en raíces y parte aérea, respectivamente) son mayores a las encontradas para la variedad enana (7 400 y 200 mg kg<sup>-1</sup>, en el mismo orden), es importante notar que en el primer caso las plantas se expusieron al metal una semana después de la germinación, mientras que en el segundo caso las semillas estuvieron en contacto con los tratamientos desde la germinación. Es importante, para futuros experimentos, determinar si existe alguna correlación entre la edad de *H. annuus* variedad híbrido 571 y la acumulación de Cr(III).

Aún cuando no se han identificado las causas por las cuales en algunas especies vegetales los quelantes promueven la absorción de metales y en otras la reducen, los resultados aquí presentados indican que *H. annuus* variedad enana muestra la ventaja de no requerir SS-EDDS para absorber cantidades significativas de Cr(III) en raíz, lo que sugiere que sería un buen candidato para la rizofiltración de este metal.

### 3.4.2 Determinación de los factores de acumulación

Con el propósito de estudiar el efecto del quelante en la eficiencia de extracción y traslocación del Cr en plantas de girasol, se obtuvieron: (a) el factor de bioconcentración en la raíz (FBR) y (b) el factor de bioconcentración en la corriente de transpiración o tallo (FBT) (Tabla 3). Se observó que a partir del día 6, el valor de ambos factores disminuyó drásticamente en la presencia del SS-EDDS. Tanto los FBR como los FBT se redujeron en un 80% o más en relación a los valores observados en plantas cuyos tratamientos no incluyeron el quelante. Estos resultados confirman que *H. annuus* se desempeña mejor en la absorción de Cr cuando no está presente el SS-EDDS en el medio de crecimiento. Esto representa una ventaja más pues se reducirían entonces los costos asociados a la fitorremediación.

Cuando se elige una planta para fitorremediación debería ser más conveniente

considerar los factores de bioconcentración y no las concentraciones finales de tejidos en plantas, ya que los primeros proporcionan información acerca de las eficiencias de extracción y traslocación.

Tabla 3. Factores de bioconcentración de Cr(III), en presencia (Cr-EDDS) y ausencia (Cr) del quelante SS-EDDS.

Día	FBR <sup>a</sup>		FBT <sup>b</sup>	
	Cr	Cr-EDDS	Cr	Cr-EDDS
3	0.15 ± 0.01	6 ± 5	0.002 ± 0	0.4 ± 0.02
6	230 ± 37	20 ± 0.5	4 ± 0.8	0.6 ± 0.02
9	200 ± 30	22 ± 11	4.5 ± 1	0.6 ± 0.3
12	180 ± 62	7 ± 1	7 ± 2	0.8 ± 0.4
15	185 ± 37	18 ± 2	5 ± 1	0.8 ± 0.2

<sup>a</sup>Factor de bioconcentración en raíz

<sup>b</sup>Factor de bioconcentración en tallo

Los datos representan valores promedio ± desviación estándar

### 3.4.3 Absorción de Cr como función del tiempo

En las figs. 3 y 4 se observa que, para los tratamientos sin SS-EDDS, durante los primeros 3 días la velocidad de absorción de Cr fue relativamente lenta y muy similar a lo observado en plantas tratadas con SS-EDDS. Sin embargo, entre los 3 y 6 días se observó un incremento súbito en la absorción que se mantiene constante hasta el día 15. En el caso de las plantas con SS-EDDS, tanto para raíz como para tallo se observa un contenido constante, lo que puede indicar que si bien la planta sigue creciendo (figs. 1 y 2), la velocidad de absorción podría estar aumentando de forma proporcional a la velocidad de crecimiento de forma que el contenido de Cr se mantiene constante.

Los datos para la absorción de Cr(III) se analizaron y trabajaron con el fin de obtener los modelos matemáticos que describan dicha absorción como función del tiempo. Se realizaron estimaciones de curva utilizando el paquete estadístico SPSS 12.0. La Tabla 4 muestra los mejores ajustes obtenidos. La mayoría de los modelos a los que se ajustaron las curvas de las cinéticas tanto de crecimiento como de absorción, fueron modelos cúbicos. El valor de R<sup>2</sup> oscila entre 0.84 y 0.95.

Tabla 4. Modelos para las cinéticas de absorción de Cr (III) para raíz y tallo en presencia y ausencia de quelante SS-EDDS.

Tratamiento	Ecuación	R <sup>2</sup>
Raíz sin quelante	$y = -2144.6 + 4314.74 t - 482.62 t^2 + 16.1055 t^3$	0.952
Tallos sin quelante	$y = 247.492 - 70.424 t + 12.6579 t^2 - 0.5363 t^3$	0.846
Raíz con quelante	$\ln(Y) = 4.9244 + (0.1083 t)$	0.951
Tallos con quelante	$y = 100.721 - 39.665 t + 5.1479 t^2 - 0.1847 t^3$	0.901

Estos resultados muestran que la acumulación del cromo en función del tiempo no es lineal y que entonces pueden intervenir otros factores que simultáneamente se están presentando en la edad y estado fisiológico de la planta.

### 3.5 Determinación del efecto del Cr(III) en la absorción de macro y micronutrientes

Se cuantificaron los macro y micronutrientes de plantas de *H. annuus* variedad enana tratadas con Cr(III) con y sin quelante. Una vez obtenidos los resultados se realizaron análisis de correlación bivariada y se obtuvieron los coeficientes de correlación de Pearson utilizando el paquete estadístico SPSS 12.0. Dichos resultados indicaron que la acumulación de Cr en tejidos de *H. annuus*, afectan negativamente la absorción de Mn (-0.345,  $P < 0.01$ ) y Mg (-0.468,  $P < 0.01$ ). No se observó disminución en el contenido de Ca, K, P, S, Mo, Cu, Fe o Zn. La deficiencia de Mg y Mn está relacionada con la clorosis en plantas (Taiz y Zeiger, 1998), por lo que es probable que la reducción de la concentración de éstos nutriente así como la reducción de clorofila, indiquen la proximidad de la aparición de clorosis.

### Conclusiones

*H. annuus* mostró un mejor desempeño en la absorción de Cr(III) de un medio acuoso cuando no está presente el quelante SS-EDDS. Esto representa una ventaja ya que los costos asociados a la fitoremediación se reducen. Adicionalmente, esta planta puede ser germinada directamente en el medio contaminado y presentará un mayor tolerancia que si se transplanta a otras edades después de la germinación. Se obtuvieron factores de bioacumulación que proporcionan información sobre la eficiencia de extracción y traslocación de Cr. Adicionalmente, los modelos matemáticos explican la absorción de Cr(III) con respecto al tiempo. Esta información permite identificar las condiciones óptimas en las cuales la planta de girasol puede absorber y acumular Cr(III) de un medio acuoso y con ello, de forma preliminar, explorar la factibilidad del uso de esta planta para fines de rizofiltración de dicho elemento.

### Agradecimientos

Agradecemos el apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Guanajuato (06-16-K117-30), CONACYT (CB-61649) y de la Universidad de Guanajuato (UG 0114/06). Jorge Gardea-Torresdey agradece a los programas LEER y STARS del sistema de la Universidad de Texas, a la National Science Foundation por los apoyos 0723115 y 0521650 y a la familia Dudley por la Endowed Research Professorship in Chemistry.

### Referencias

- Alvarez, S.G., Maldonado, M., Gerth, A. y Kusch, P. (2004). Caracterización de agua residual de curtiduría y estudio del lirio acuático en la recuperación de cromo. *Información Tecnológica* 15-3, 75-80.
- Barceló, J. y Poschenrieder, C. (2003). Phytoremediation: principles and perspectives. *Contributions to Science* 2, 333-344.
- Brooks, R. R. (1998). *Plants that hyperaccumulate heavy metals: their role in phytoremediation, microbiology, archeology, mineral exploration and phytomining*. CAB International, Oxon, U.K.
- Bucheli-Witschel, M. y Egli, T. (2001). Environmental fate and microbial degradation of aminopolycarboxylic acids. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 69-106.
- Carrillo-Castañeda, G., Juárez Muñoz, J., Peralta-Videa, J. R., Gomes, E., Duarte-Gardea, M., Tiemann, K. J. y Gardea-Torresdey, J.L. (2002). Alfalfa Growth Promotion by Bacteria Grown Under Iron Limiting Conditions. *Advances in Environmental Research* 6-3, 391-399.
- Crawford, N.M., Kahn, M.L., Leustek, T. y Long, S.R. (2000). Nitrogen and Sulfur. En: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (B.B. Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones, eds). Courier Companies Inc, U.S.A.
- Davies Jr., F.T., Puryear, J.D., Newton, R.J., Egilla, J.N., Saraiva Grossi, J.A. (2002). Mycorrhizal fungi increase chromium uptake by sunflower plants: influence on tissue mineral concentration, growth and gas exchange. *Journal of Plant Nutrition* 25-11, 2389-2407.
- De la Rosa, G. (2005). *Use of modern spectroscopic techniques to study heavy metal accumulation and uptake mechanisms in tumbleweed*. Doctoral Dissertation, The University of Texas at El Paso. U.S.A.
- De la Rosa, G., Peralta-Videa, J.R., Cruz-Jimenez, G., Duarte-Gardea, M., Martinez-Martinez, A., Cano-Aguilera, I., Sharma, N.C., Sahi, S.V., Gardea-Torresdey, J.L. (2007). Role of Ethlenediaminetetraacetic acid on lead uptake and translocation by tumbleweed (*Salsola kali* L.) *Environmental Toxicology and Chemistry* 26-5, 1033-1039.
- Gardea-Torresdey, J. L., Peralta-Videa, J. R., de la Rosa, G., Parsons, J. G. (2005). Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy. *Coordination Chemistry Reviews* 249, 17-18, 1797-1810.
- Hossner, L.R. (1996). *Phytoaccumulation of selected heavy metals, uranium and plutonium in plant systems*; Texas A&M University: College

- Station, TX. Quart. Prog. Rep. Nov 1995–Jan 1996, Project UTA96–0043.
- January, M.C., Cutright, T.J., Van Keulen, H., Wei, R. (2008). Hydroponic phytoremediation of Cd, Cr, Ni, As, and Fe: Can *Helianthus annuus* hyperaccumulate multiple heavy metals? *Chemosphere* 70-3, 531-537
- Kornhauser, C., Wróbel, K., Wróbel, K., Malacara, J.M., Nava, L.E., Gómez, E., González, R. (2002). Possible Adverse Effect of Chromium in Occupational Exposure of Tannery Workers. *Industrial Health* 40, 207-213.
- Máthé-Gáspár, G., Anton, A. (2005). Phytoremediation study: factors influencing heavy metal uptake of plants. *Proceedings of the 8<sup>th</sup> Hungarian Congress on Plant Physiology and the 6<sup>th</sup> Hungarian Conference on Photosynthesis* 49, 1-2, 69-70.
- Bejjian, M., Puryear, J.D., Newton, R.J. (2002). Assessment of Cr tolerance and accumulation in selected plant species. *Plant and Soil* 247, 223-231.
- Meers, E., Ruttens, A., Hopgood, M.J., Samson, D., Tack, F. M. G. (2005). Comparison of EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Chemosphere* 58, 1011-1022.
- Meers, E., Vandecasteele, B., Ruttens, A., Vangronsveld, J., Tack F.M.G. (2007). Potential of five willow species (*Salix* spp.) for phytoextraction of heavy metals. *Environmental and Experimental Botany* 60, 57–68.
- Mallick, N. and Mohn, F.H. (2003). Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55-1, 64-69.
- Nowack, B., VanBriesen, J.M. (2005). Chelating agents in the environment. En: *Biogeochemistry of chelating agents*; Nowack, B., VanBriesen, J.M., eds.; ACS Symposium series; American Chemical Society, Washington DC, 910, 1-18.
- Peralta, J. R., Gardea-Torresdey, J. L., Tiemann, K. J., Gomez, E., Arteaga, S., Rascon, E., Parsons, J. G. (2001). Uptake and Effects of Five Heavy Metals on Seed Germination and Plant Growth in alfalfa (*Medicago sativa* L). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 66, 727-734.
- Peralta-Videa, J. R., De La Rosa, G., Gonzalez, J. H., Gardea-Torresdey, J. L. (2004). Effect of heavy metals on alfalfa plants at different growth stages. *Advances in Environmental Research* 8, 3-4, 679-685.
- Robles-Camacho, J., Armienta, M. A. (2000). Natural chromium contamination of groundwater at Leon valley, Mexico. *Journal of Geochemical Exploration* 68-3, 167-181.
- Salisbury, F.B. y Parke, R.V. (1968). *Las plantas vasculares, forma y función*. Herrero Hermanos, México.
- Seginer, I. (2004). Equilibrium and balanced growth of a vegetative crop. *Annals of Botany* 93, 127-139.
- Silva-Gonzaga, M.I., Ma, L.Q., Santos, J. A. G. (2007). Effects of Plant Age on Arsenic Hyperaccumulation by *Pteris vittata* L. *Water, Air & Soil Pollution* 186, 1-4, 289-295.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (1998) *Plant physiology* (2<sup>nd</sup> Ed.) Sinauer Associates, Inc. Publishers, USA.
- Tandy, S., Schulin, R., Nowack, B. (2006). The influence of EDDS on the uptake of heavy metals in hydroponically grown sunflowers. *Chemosphere* 62, 1454–1463
- USEPA. United States Environmental Protection Agency (2005). <http://www.epa.gov/ordntrnt/ORD/NRMRL/lrpd/rr/phytotce.htm>
- Yoon, J., Xinde, C., Qixing, Z., Ma, L.Q. (2006). Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment* 369, 2-3, 456-464.