



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**EVALUACIÓN DEL ESTRÉS ABIÓTICO EN *Brachiaria*
spp. INDUCIDO POR BIOACUMULACIÓN DE CADMIO Y
PLOMO, EN UNA ZONA ALEDAÑA AL CORREDOR
PETROLÍFERO DE BARRANCABERMEJA (COLOMBIA)**

Manuel José Peláez Peláez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela de Posgrados
Palmira, Colombia

2013

EVALUACIÓN DEL ESTRÉS ABIÓTICO EN *Brachiaria Spp.* INDUCIDO POR BIOACUMULACIÓN DE CADMIO Y PLOMO, EN UNA ZONA ALEDAÑA AL CORREDOR PETROLÍFERO DE BARRANCABERMEJA (COLOMBIA)

Manuel José Peláez Peláez

Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al título de
Doctor en Ciencias Agrarias

Director (a):

Ph.D. Eyder Daniel Gómez López

Codirector (a):

Ph.D. Fanor Casierra Posada

Línea de Investigación:

Protección de Cultivos

Grupo de Investigación:

Recursos Naturales y Plantas Medicinales y Aromáticas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela de Posgrados

Palmira, Colombia

2013



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE PALMIRA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

DOCTORADO EN CIENCIAS AGRARIAS
LINEA DE INVESTIGACIÓN PROTECCIÓN DE CULTIVOS

En Palmira a los 03 días del mes de Diciembre de 2013, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores GERARDO ANDRÉS TORRES RODRIGUEZ, CARLOS GERMAN MUÑOZ PEREA y JOHN JAIRO BUSTAMANTE CANO.

Para calificar la Tesis de Grado de:

MANUEL JOSÉ PELAEZ PELAEZ


Titulada:


"EVALUACIÓN DEL ESTRÉS ABIÓTICO EN *Brachiaria* spp. INDUCIDO POR BIOACUMULACIÓN DE CADMIO Y PLOMO, EN UNA ZONA ALEDAÑA AL CORREDOR PETROLIFERO DE BARRANCABERMEJA (COLOMBIA)" bajo la dirección de los Doctores Eyder Daniel Gómez y Fanor Casierra Posada.

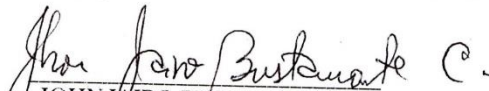
Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los doctores GERARDO ANDRÉS TORRES RODRIGUEZ, CARLOS GERMAN MUÑOZ PEREA y JOHN JAIRO BUSTAMANTE CANO, y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADA

REPROBADA


GERARDO ANDRÉS TORRES R.


CARLOS GERMAN MUÑOZ P.


JOHN JAIRO BUSTAMANTE C.

“El mejor homenaje que se le puede hacer a un fitoproteccionista es no hacer a una plaga o a un patógeno importante”

Frase de mis cursos de Epidemiología Agrícola

Dedico este trabajo con profundo amor a mis seres más queridos: mis padres Manuel y Beatriz, mi esposa Ninfa, mis hijos e hijas (Sebastian, Manuel Alejandro, Manuela e Isabella). Sin su apoyo, cariño y afecto difícilmente este sueño se hubiese cumplido.

A mis compañeros y amigos del Doctorado Javier Osorio, Herminio Paredes, Javier Restrepo y Hector Ordoñez, mil gracias por su acompañamiento y fraternidad.

A mis estudiantes, por su permanente estímulo.

Agradecimientos

Muy especiales:

Universidad de Pamplona, por confiar en mí, en el desarrollo de esta tesis. Universidad Nacional de Colombia, por todo el bagaje conceptual y académico para culminar esta tesis doctoral y finalmente a Colciencias por el apoyo con recursos para desarrollar éste trabajo de investigación.

A mis directores y asesores:

Eyder Daniel Gómez López por su disciplina y compromiso con sacar todo adelante y Fanor Casierra Posada por todo su apoyo en la dirección de este trabajo y por introducirme en el mundo de la *Ciencia del Estrés en Vegetales*.

A los profesores, Juan Carlos Mejivar Flórez, Sara Mejía de Tafur, Jaime Eduardo Muñoz Flórez, Manuel Salvador Sánchez y Carmen Rosa Bonilla por su constante apoyo para resolver las inquietudes a lo largo de este proceso.

Andres Torres Rodríguez, por su visión en torno a la complejidad del mundo de los metales vistos desde un microscópio.

A todos mis docentes del Doctorado en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, quienes en sus cursos fueron inspiradores permanentes de crecimiento académico.

A mi esposa Ninfa quien me apoyo con su trabajo y tiempo en el invernadero, a los auxiliares Hector y Monica de los laboratorios de Fisiología Vegetal en la Universidad Nacional de Colombia y en la Universidad de Pamplona, quienes siempre estuvieron dispuestos a colaborar en todo. Un agradecimiento muy especial al Magister Efren Muñoz, por su apoyo en el objetivo de Microscopia MOAR y TEM, y a mí estudiante tesista Nathly Vargas, por su dedicado trabajo en su proyecto de grado derivado de esta tesis doctoral.

A mi hermano Carlos Mauricio Peláez y José Fernando Díaz, por su revisión de textos.

Resumen

En el Magdalena Medio colombiano confluyen actividades ganaderas y una avanzada industria petroquímica; esta última genera una gran cantidad de efluentes como los metales pesados, en detrimento de los agroecosistemas de pastura. Esta investigación evidenció un núcleo problemático, que va desde la acumulación de Cadmio y Plomo en suelos aledaños a esta industria, que bioacumula metales en raíces, tallos y hojas en estas pasturas de trópico bajo. Estos metales traza en suelo y tejidos vegetales se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Se confirmaron las hipótesis sobre una mayor acumulación de estos metales en los suelos más cercanos a los focos de contaminación y sobre la bioacumulación en los tejidos vegetales en un orden creciente en raíces, tallos y hojas. Finalmente, se elaboró una escala de reacciones sintomáticas ante la situación de estrés abiótico inducido hacia *Brachiaria Arrecta*.

Palabras clave: pasturas tropicales, fisiopatías, metales traza, Cadmio, Plomo.

Abstract

In the colombian Middle Magdalena converging livestock and a developed petrochemical industry, the latter generates a large amount of effluents and heavy metals at the expense of pasture agroecosystems. This research evidenced a core problem, ranging from the persistence of cadmium and lead in soils adjacent to this industry, which bioaccumulate metals in roots, stems and leaves in these tropical pastures. These metals traced in soil and plant tissues were determined by atomic absorption spectrometry in the Laboratory of Plant Physiology, in The National University of Colombia in Palmira. We confirmed the hypothesis that there is greater accumulation of these metals in soils closer to the sources of pollution and bioaccumulation in plant tissues in an increasing order from the roots, stems and leaves. Finally, we drew up a scale of symptomatic reactions to abiotic stress situation induced to *Brachiaria Arrecta*.

Keywords: tropical pastures, trace metals, physiological diseases in plants, cadmium and lead.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XIV
Lista de tablas	XVII
Introducción	1
Capítulo 1	5
OBJETIVOS Y PLAN GENERAL DE TRABAJO	5
1.1 Objetivo general.....	5
1.2 Objetivos específicos	5
Capítulo 2	9
MARCO REFERENCIAL	9
2.1 Marco teórico.....	9
2.1.1 Producción de pasturas en el trópico bajo en Colombia, aledaña al corredor petrolífero de Barrancabermeja (Santander).	12
2.1.2 Metales pesados como elementos contaminantes y tóxicos.....	19
2.1.3 Estrés ambiental en plantas	26
2.2. Marco legal.....	33
2.3 Antecedentes	42
Capítulo 3	45
RESULTADOS	45
3.1. ESTIMACIÓN DE FRECUENCIAS DE GÉNERO <i>Brachiaria</i> EN CAMPO Y SUS CONTENIDOS BIOACUMULADOS DE CADMIO Y PLOMO, EN TEJIDOS VEGETALES DE RAÍZ, TALLO Y HOJAS.....	45
3.1.1 Marco teórico.....	48
3.1.2 Materiales y métodos	53
3.1.3 Resultados y discusión	57
3.1.4 Determinación de los contenidos de Cadmio y Plomo en tejidos vegetales en raíz, tallo y hojas en poblaciones de <i>Brachiaria</i> en campo	69
3.1.5 ANOVAS multifactoriales por componentes vegetales (raíz, tallos y hojas)	75
3.1.6 Conclusiones.....	83

3.2 CARACTERIZAR LAS FISIOPATIAS ASOCIADAS A ESTRÉS POR CADMIO Y PLOMO EN <i>Brachiaria arrecta</i> BAJO CONDICIONES DE IINVERNADERO	85
3.2.1 Marco teórico	87
3.2.2 Trabajos relacionados	90
3.2.3 Materiales y métodos	91
3.2.4 Resultados y discusión	96
3.2.5 Conclusiones	130
3.3.EVIDENCIA DE CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES CAUSADOS POR CADMIO Y PLOMO EN TEJIDOS DE <i>Brachiaria arrecta</i> (HACK. EX T. DURAND & SCHINZ) STENT.....	131
3.3.1 Marco teórico	133
3.3.2 Trabajos relacionados	136
3.3.3 Materiales y métodos	136
3.3.4 Procedimiento experimental.....	137
3.3.5 procedimiento y observación de ultraestructuras	138
3.3.6 Resultados y discusión	139
3.3.7 Conclusiones	156
4. Recomendaciones	157
A. Anexo: ANAVAS variables morfométricas en la fase de invernadero.....	159
B. Anexo: Prueba de Múltiples rangos de Bonferroni para la variable (Peso fresco planta en gramos) dopada, con las diferentes concentraciones de Cadmio y Plomo	165
C. Pruebas de Múltiple rangos de Bonferroni para la variable (peso seca planta en gramos) dopada con las diferentes concentraciones de Cadmio y Plomo	166
D. Pruebas de Múltiple Rangos de Bonferroni para la variable (peso fresco raíz en gramos) dopada, con los diferentes concentraciones de Cadmio y Plomo	167
E. Pruebas de Múltiple Rangos de Bonferroni para la variable (peso seco raíces en gramos) dopada, con los diferentes concentraciones de Cadmio y Plomo	168
F. Pruebas de Múltiple Rangos de Bonferroni para la variable (longitud de raíces en centímetros) dopada, con los diferentes concentraciones de Cadmio y Plomo.....	169
G. Pruebas de Múltiple Rangos de Bonferroni para la variable (longitud total planta en centímetros) dopada, con los diferentes concentraciones de Cadmio y Plomo	170
H. Pruebas de Múltiple Rangos de Bonferroni para la variable (diámetro de raíces en mm) dopada, con los diferentes concentraciones de Cadmio y Plomo.....	171
I. Pruebas de Múltiple Rangos de Bonferroni para la variable (volumen de raíces) dopada, con los diferentes concentraciones de Cadmio y Plomo.	172
Bibliografía	173

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Animales pastoreando en suelos con dos diferentes fuentes de contaminación	58
Figura 2. Gráfico frecuencia de géneros encontrados en los tres corredores de estudio.....	61
Figura 3. Número de ejes retenidos.	62
Figura 4. Bigráfica en dos dimensiones de componentes principales uno y dos, en estudio exploratorio de campo, mostrando variables con mayor peso explicativo.....	66
Figura 5. Especies de <i>Brachiaria</i> encontrados en los tres corredores de estudio.....	70
Figura 6. Frecuencias de especies de <i>Brachiaria</i> por zona y por transecto.....	71
Figura 7. Bigráfica peso de los componentes principales,mostrando interacciones entre las variables en campo.....	74
Figura 8. Gráficos de ANOVAS multifactoriales, para bioacumulación de los metales pesados Cadmio y Plomo.....	80
Figura 9. Gráficos de contorno (método de ARIMA) para gradientes de bioacumulación de Cd y Pb en hojas, tallos y raíces, en relación a zonas y distancias focales.....	81
Figura 10. Detalle del montaje del diseño experimental en invernadero bajo un sistema hidropónico.....	94
Figura 11. Plantas de <i>B. arrecta</i> mostrando síntomas fisiopáticas en campo.....	97
Figura 12. Plantas de <i>B. arrecta</i> intoxicadas con Ca y Pb.....	99
Figura 13. Pastura de <i>B. arrecta</i> dopadas con sales de Cadmio y Plomo, 72 horas después.....	101
Figura 14. Detalles de las pastura <i>B. arrecta</i> intoxicadas con Cd, Pb y Cd x Pb, 72 horas después.....	103

Figura 15. Síntomas detallados en planta y ampliación de los mismos por estrés temprano a 72 horas del dopaje por Plomo (Pb) en <i>B. arrecta</i>	104
Figura 16. Síntomas detallados en planta y ampliación de los mismos, por estrés temprano a 72 horas del dopaje por Cadmio (Cd) en <i>B. arrecta</i>	105
Figura 17. Síntomas detallados en planta y ampliación de los mismos por estrés temprano a 72 horas, del dopaje combinado de las sales de Cadmio y Plomo en <i>B. arrecta</i>	106
Figura 18. Síntomas de toxicidad por metales pesados en componentes vegetales aéreos y de suelo, 168 horas después del dopaje (7 días).....	107
Figura 19. Escala de estadios crecientes de síntomas tóxicos por plomo en hojas, planta y raíces.....	109
Figura 20. Escala de estadios crecientes de síntomas tóxicos por cadmio en hojas, planta y raíces.....	110
Figura 21. Gráfico de medias de Bonferroni para la variable peso fresco planta, en relación a los tratamientos.....	112
Figura 22. Gráfico de medias de Bonferroni para la variable peso seco planta, en relación a los tratamientos.....	113
Figura 23. Gráfico de medias de Bonferroni para la variable peso fresco raíz, en relación a los tratamientos	114
Figura 24. Gráfico de medias de Bonferroni para la variable peso seco raíces, en relación a los tratamientos.....	115
Figura 25. Gráfico de medias de Bonferroni para la variable longitud de raíces, en relación a los tratamientos.....	117
Figura 26. Gráfico de medias de Bonferroni para la variable longitud total planta, en relación a los tratamientos	118
Figura 27. Gráfico de medias de Bonferroni para la variable área foliar, en relación a los tratamientos.....	120
Figura 28. Gráfico de medias Bonferroni para la variable diámetro de raíces, en relación a los tratamientos.....	122
Figura 29. Gráfico de medias de Bonferroni para la variable volumen de raíces, en relación a los tratamientos.....	123
Figura 30. Gráfico de medias Bonferroni para la variable potencial hídrico, en relación a los tratamientos.....	126

Figura 31.	Síntomas macroscópicos de <i>B. arrecta</i> intoxicadas con Cd y Pb: A. planta presentando daños fisiopáticos por cadmio en tallo y hojas.....	140
Figura 32.	Síntomas macroscópicos y ultraestructurales en raíces de <i>B.arrecta</i>	142
Figura 33.	Síntomas macroscópicos y ultraestructurales en tallos de <i>B. arrecta</i>	143
Figura 34.	Síntomas macroscópicos y ultraestructurales en hojas de <i>B. arrecta</i>	144
Figura 35.	Microfotografías de células normales de <i>B. arrecta</i> en raíz, tallo y hoja.....	146
Figura 36.	Cloroplasto de hoja en el control después de 96 horas de estar la planta en solución nutritiva de Hoagland.....	148
Figura 37.	Daños a cloroplastos en células de hojas por Cadmio de una planta de <i>B. arrecta</i> expuesta a la sal CdCl ₂ 10ppm, después de 96 horas.....	149
Figura 38.	Aspecto deformado de cloroplasto y daños a membranas y componentes de células de parénquima clorofiliano en hojas de <i>B. arrecta</i> expuesta a la sal Pb (NO ₃) ₂ 500 ppm, después de 96 horas.....	150
Figura 39.	Microfotografías de raíz de <i>B. arrecta</i> . A. Control a las 96 horas en solución nutritiva.....	152
Figura 40.	Microfotografías de tallo de <i>B. arrecta</i> . Planta control a las 96 horas en solución nutritiva de Hoagland, mostrando aspectos de la pared celular.....	153

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Umbrales de contaminación referenciados para Cadmio en diversos escenarios agrícolas, según normativas internacionales.....	35
Tabla 2. Umbrales de contaminación referenciados para Plomo en diversos escenarios agrícolas, según normativas internacionales.....	38
Tabla 3. Análisis de Componentes Principales.....	61
Tabla 4. Peso de los componentes ambientales en las observaciones de campo.....	64
Tabla 5. Análisis de Componentes Principales.....	73
Tabla 6. Pesos de los Componentes Principales (PCA).....	73

Lista de cuadros

	Pág.
Cuadro 1. Alteraciones en plantas por presencia de diferentes metales pesados.....	32
Cuadro 2. Límites máximos permisibles para metales pesados y cianuros. Para México.....	34
Cuadro 3. Niveles internacionales de referencia de metales pesados.....	34
Cuadro 4 Niveles de Umbral y de intervención para contaminación para Cadmio y Plomo.....	41
Cuadro 5 Frecuencia para las principales familias botánicas encontradas en la zona.....	59
Cuadro 6 Resumen de datos de diversidad y riqueza de especies.....	668
Cuadro 7 Valores consolidados de acumulación en suelos y bioacumulación en componentes vegetales, por zonas y por transectos (fase de campo).....	72
Cuadro 8 Escala de evaluación de daños, por aspersion de herbicidas.....	89
89Cuadro 9 Tratamientos aplicados en el estudio.....	94
Cuadro 10 Protocolos Análisis Foliares.....	96
Cuadro 11 Niveles de referencia en análisis foliares para pastos y forrajes de trópico.....	96
Cuadro 12 Análisis foliares a plantas intoxicadas con metales pesados [Cd 10 ppm, Pb 500 ppm y en mezcla (Cd 10 ppm y Pb 500 ppm)].....	101

Cuadro 13.	Tratamientos aplicados en la solución hidropónica.....	138
-------------------	--	-----

08

Introducción

En Colombia el problema de la contaminación que genera la explotación de los recursos no renovables como el petróleo y la minería, se va incrementando con el paso del tiempo. Estas industrias, originan acumulación de metales tóxicos en el suelo como Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Plomo (Pb), Vanadio (V), Zinc (Zn), Mercurio (Hg) y Molibdeno (Mo), afectando por consiguiente toda la red trófica (Sánchez *et al.*, 2007). En algunas zonas del país reconocidas por sus actividades extractivas de recursos no renovables como el petróleo o de refinamiento del crudo, es común encontrar la presencia de praderas con pasturas predominantemente del género *Brachiaria*. En Barrancabermeja (Santander), se encuentra localizada la estatal petrolera: Empresa Colombiana de Petróleos - ECOPELROL-, donde se cuenta con la refinería petrolífera más grande del territorio nacional, pero también con una amplia zona dedicada a las actividades ganaderas, con predominio de pasturas rústicas en cuanto al manejo como las especies de *Brachiaria*.

Estas pasturas del género *Brachiaria* que han sido mejoradas y liberadas por los sistemas disciplinarios de mejoramiento genético en centros de investigación tanto nacionales como internacionales, se han destacado por sus excelentes cualidades forrajeras, tolerancia a las sequías, baja fertilización, suelos ácidos y exceso de humedad.

Algunos productores ganaderos e investigaciones realizadas por Hernández (1997) y Canchila *et al.*, (2011), han proporcionado información tendiente a relacionar para estas regiones cambios ocurridos en sus sistemas de producción tanto agrícolas como pecuarios, como consecuencia del papel que juegan los metales pesados como elementos xenobióticos producto de la contaminación antrópica derivados de la industria petrolera, subrayando cómo este influjo negativo, introduce efectos nocivos que vician el medio ambiente y el clima de la zona. En este sentido, la contaminación por petróleo se produce por su liberación accidental o intencionada en el ambiente, provocando efectos adversos sobre el hombre o sobre el medio, de manera directa o indirecta. Este tipo de contaminación relaciona todas las operaciones como la explotación y transporte de

hidrocarburos, de tal manera que es inevitable el deterioro gradual del ambiente, afectando en forma directa la integración del sistema abierto: suelo-agua-aire-fauna-flora y el hombre (EPA; 2007, Santschi *et al.*, 2001). Los metales tóxicos pesados pueden moverse en escenarios ambientales diversos, desde lo microscópico hasta lo macroscópico y dar origen a la degradación de estos recursos afectando la biodiversidad y la salud de los sistemas vivos (plantas, animales y los mismos seres humanos) (Barceló y Poschenrieder, 2002; Carrascal *et al.*, 2005).

El hombre ha conseguido altos grados de desarrollo que son representados en crecimiento de población, sumado a un elevado volumen de capacidad tecnológica en muchas de sus actividades con una fuerte incidencia negativa sobre el medio ambiente y los agroecosistemas. El impacto provocado genera consecuencias diversas, que afectan tarde o temprano los complejos sistemas vivos. Las redes tróficas, que están presentes en la tierra, han empezado a manifestar efectos adversos como producto de esas alteraciones: el deterioramiento de la capa de ozono, el efecto invernadero, el cambio climático, especies al borde de la extinción y el incremento de patologías en seres humanos, en animales y en plantas a raíz de la contaminación, de tal manera que la extensión de estos hechos, ha dejado de ser un cúmulo de problemas locales para convertirse en complejos irreversibles de progresión global (Madero y Marrugo, 2011).

La presunción investigativa en este trabajo doctoral, afronta inquietudes como cuál es el grado de conocimiento que se posee en los países como el nuestro sobre la vulnerabilidad de un agroecosistema de pastura, ante un tipo de estrés abiótico como lo es la presencia de metales pesados como Cadmio y Plomo, en zonas aledañas a cúmulos de una alta actividad antrópica, y si es posible determinar cómo estos xenobióticos pueden perturbar una condición fisiológica endógena o exógena propia a este monocultivo extensivo, como la nutrición mineral, la tasa de fotosíntesis, la transpiración, los componentes de rendimiento y tasa de renovación de biomasa. También está el interrogante sobre si estas gramíneas una vez que germinan pueden evitar o tolerar el estrés y cuál es su costo en la ecología (abundancia y riqueza de especies), en la distribución o frecuencia en las respuestas al estrés y como éste determina razones de sobrevivencia geográfica de las mismas especies. Así mismo, qué tanto es afectado el metabolismo en estas pasturas, y si son la resultante de un cambio en la expresión génica (Andaluz *et al.*, 2006). Se debe tener en cuenta que las plantas como productores primarios deben ser prioridad para

cualquier estudio de vigilancia e inspección epidemiológica en Salud Pública (*humana o animal*).

Por esta razón, se propone estudiar: ¿realmente existe “bioacumulación” y “estrés abiótico” por contaminación de metales pesados, asociados a la explotación y refinación del petróleo, en estas gramíneas forrajeras como Brachiaria spp.? Y ¿epidemiológicamente, es posible reconocer en estos estreses, problemas asociados a fisiopatías con consecuencias en la Salud Pública Vegetal y su repercusión con toda una red trófica?

Capítulo 1

OBJETIVOS Y PLAN GENERAL DE TRABAJO

1.1 Objetivo general

“Evaluar la presencia de metales pesados y su efecto deletéreo (estrés abiótico y daños fitotóxicos), en tejidos vegetales (raíz, tallo y hojas) de *Brachiaria* spp, en algunas zonas aledañas a la refinería petrolífera y campos de explotación de crudo en Barrancabermeja (Colombia)”.

Se establecieron parámetros investigativos correctos que ayudarán a esclarecer conjeturas propias del inicio de un camino que quizás se desconocía como es el impacto del estrés abiótico por metales en estas poblaciones de forrajes tropicales.

1.2 Objetivos específicos

Estimar frecuencias de géneros de *Brachiaria* y sus contenidos bioacumulados de cadmio y plomo, en tejidos vegetales de raíz, tallo y hojas.

Para cumplir con este objetivo primario, inicialmente se planteó sobre la base realizar un estudio exploratorio a manera de inventario de las pasturas tropicales propias a la región

6 Evaluación del estrés abiótico en *Brachiaria spp.* Inducido por bioacumulación de cadmio y plomo, en una zona aledaña al corredor petrolífero de Barrancabermeja (Colombia)

en el Magdalena Medio Colombiano y que se hubieran adaptado a los ambientes petrolíferos. Se seleccionaron tres corredores ecológicos y cuatro transectos por cada uno (zonas y subzonas), donde se evaluó en primera instancia qué pasturas eran dominantes y posteriormente sobre el género botánico y sus especies más prevalentes a lo largo de cada corredor se estudiaron los niveles de acumulación de los metales pesados Cadmio y Plomo. Se tomaron muestras vegetales y de suelo aledaño por triplicado mediante cuadrantes anidados, a profundidades de 5 y 30 centímetros. Se determinó la persistencia de los metales en el suelo y su bioacumulación en las plantas por estudios de química analítica (espectrometría de absorción atómica). Con estas metodologías se logró confirmar las hipótesis planteadas. Posteriormente una vez se determinó la dominancia de las pasturas introducidas y mejoradas de *Brachiaria*, se dirigió el estudio a relacionar niveles de bioacumulación de los metales en los tejidos vegetales de estas pasturas.

Caracterizar las fisiopatías asociadas a estrés por cadmio y plomo en *Brachiaria arrecta* bajo condiciones de invernadero.

Para llevar a cabo este objetivo se planeó realizar el trabajo en condiciones de invernadero en forraje hidropónico con soluciones nutritivas Hoaglands y sometimiento a dopaje metalífero del material vegetal de *Brachiaria arrecta*, se estresaron con ambos tóxicos a concentraciones medias y anómalas con sales de CdCl_2 a 1,5 y 10 ppm, y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a 150 y 500 ppm, respectivamente. Se les hizo seguimiento permanente en el tiempo sobre inicio y avance de los síntomas en raíces, tallos y hojas, lo que permitió hacer el diseño de una escala de reacciones crecientes por toxicidad con estos metales y complementarlo con la evaluación de parámetros morfofisiométricos de las plantas expuestas.

Evidenciar los cambios ultraestructurales que ocurren por efecto tóxico de cadmio y plomo en diferentes tejidos vegetales de *Brachiaria arrecta*.

Este objetivo comprendió el observar la histopatología característica por el estrés inducido con estos metales, evidenciado daños en tejidos y células de raíces, tallos y hojas, mediante técnicas de Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM); fue posible ampliar el conocimiento al respecto sobre

los efectos de este tipo de estrés ambiental sobre la pastura tropical *Brachiaria* que es quizás el agroecosistema más extenso en Colombia.

Capítulo 2

MARCO REFERENCIAL

NÚCLEO PROBLEMÁTICO

“El que nos encontremos tan a gusto en plena naturaleza proviene de que ésta no tiene opinión sobre nosotros.”

Friedrich Nietzsche

2.1 Marco teórico

El sector petrolero en la economía de Colombia, tiene un fuerte peso en la generación de divisas. La dinámica de este sector extractivo se ha reflejado en el Producto Interno Bruto del país, pues entre el 2002 y el 2008 el PIB del sector petrolero se triplicó, pasando de \$ 8,1 miles de millones (3,5% del PIB país) a \$23,3 miles de millones en el 2008 (4,9% del PIB total). Pese a este crecimiento económico generado por la exploración y explotación de este recurso no renovable, su industria va en contravía con la sostenibilidad futura del planeta, ya que, la contaminación por petróleo (hidrocarburos o metales pesados) se caracteriza por su persistencia en el ecosistema, a pesar de los procesos de degradación natural y/o antrópica a que puedan ser sometidos (Santschi *et al.*, 2001). La contaminación por metales pesados tiene un pronunciado efecto sobre las propiedades químicas y

microbiológicas de un suelo, pudiendo impedir o retardar el crecimiento de poblaciones vegetales sobre el área contaminada (Puga *et al.*, 2006).

La absorción de metales pesados por las plantas es generalmente el primer paso de su entrada en la cadena alimentaria, posteriormente la acumulación dependerá del movimiento de los metales desde la solución suelo a la raíz de la planta. Después de la absorción por los vegetales de los metales, estos quedan disponibles para los herbívoros y humanos directamente o a través de la cadena alimentaria (Razo, 2002; Kabata y Pendías, 2001). La problemática por el impacto sobre el recurso suelo, por efecto de las altas concentraciones de estos elementos genera una serie de problemas en corredores de actividad extractiva, donde hay muerte de animales, enfermedades crónico degenerativas en las personas y baja o nula productividad agrícola (Madero y Marrugo, 2011). Diversos estudios han mostrado, que los animales reflejan las concentraciones de elementos tóxicos cuando pastan en suelos contaminados (Storelli *et al.*, 2011), se hace necesario así el control de los metales en los ecosistemas terrestres (Rodríguez *et al.*, 2008).

El valor nutritivo de las pasturas tropicales se puede ver afectado por problemas fisiopáticos, como consecuencia de la bioacumulación de algunos metales pesados, hecho que aún no ha sido estudiado para estos agroecosistemas forrajeros. En las últimas décadas se ha generalizado en varios países de América Central y Sudamérica, en los sistemas de producción ganadera, el uso de gramíneas del género *Brachiaria* como la principal fuente de alimentación de los bovinos (Canchila *et al.*, 2010); las más distribuidas son: *Brachiaria humidicola*, *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria ruziziensis* y *Brachiaria radicans* (Mármol, 2006).

Investigadores como Olivera *et al.*, (2008) y Canchila *et al.*, (2011), afirman que la capacidad de adaptación de este género se expresa en ciertas características agronómicas, como son: la producción de hojas y pequeños rizomas que facilitan la emergencia de los tallos, su tasa de crecimiento y su alta capacidad para la producción de forraje en condiciones estresantes, que pueden aumentar los rendimientos productivos de la ganadería. No obstante, falta escalrecer si en estos pastizales es posible que se cause

detrimentos por bioacumulación o por estrés metalífero que repercutan en la sanidad vegetal de estas poblaciones, enfocadas a caracterizar un daño directo (patógenos abióticos), o por un daño indirecto (factor de predisposición a daños deletéreos por patógenos bióticos). Así mismo, tampoco se conoce en esta dinámica del estrés por metales pesados, si estos influyen de manera negativa o positiva, sobre la expresión y supervivencia de un patógeno biótico, o el grado de susceptibilidad o resistencia de un hospedante (efectos o beneficios colaterales, Falcone y Pritchard, 2005).

Pretender abordar las bases epidemiológicas de un problema en Salud Pública como la amplia y variada fuente de exposición a los metales tóxicos en poblaciones animales y humanas supone una preocupación importante por sus fisiopatías o toxicidad aguda y crónica (Lauwerys y Hoet, 2001). Autores como Zubero y otros (2008), plantean la existencia marcada de indicadores biológicos de exposición ambiental a estos metales que han sido contrastados con suficiencia en la salud laboral y pública, especialmente la vía alimentaria o dérmica, entre otras. Beyersmann y Hartwig en el (2008) mencionan que estos metales pesados entre los que se encuentran el plomo, el cromo, el cadmio, el berilio y el mercurio, son considerados cancerígenos; en el caso del plomo y el mercurio preocupa especialmente su neurotoxicidad IARC (International Agency for Research on Cancer, 1993). Järup en el (2003) y Zhixuan *et al.*, en el (2012), afirman que existen otras patologías asociadas posiblemente con ambientes contaminados por metales como el cromo que es un alergénico; el cadmio por su parte produce afectación pulmonar, renal, osteomalacia y osteoporosis y el plomo daño renal y anemia.

Colombia como nación petrolera y minera que está inmersa en la franja tropical no está ajena a este tipo de problemas ambientales, en la perspectiva de estar expuesta a patosistemas de origen abiótico, y más ahora que el país ha fijado como política de desarrollo la promoción a gran escala de las explotaciones mineras y petrolíferas en zonas con vocación histórica hacia producciones agrícolas y pecuarias (Avellaneda, 1998).

La Misión y Visión del Ministerio de Minas y Energía en la administración del presidente de los colombianos, el Doctor Juan Manuel Santos Calderón, es formular y adoptar políticas dirigidas al aprovechamiento sostenible de los recursos mineros y energéticos para contribuir al desarrollo económico y social del país; de esta manera, el gobierno plantea en su visión que al finalizar la segunda década lo siguiente:

- 12 Evaluación del estrés abiótico en *Brachiaria spp.* Inducido por bioacumulación de cadmio y plomo, en una zona aledaña al corredor petrolífero de Barrancabermeja (Colombia)
-

“(…) En el 2019 el Ministerio de Minas y Energía consolidará las políticas para ser el polo de inversión en la explotación ambientalmente sostenible de los recursos minero energéticos en Colombia, alcanzar el abastecimiento eficiente para el país y exportar los excedentes a mercados internacionales, mediante recurso humano competente, tecnología avanzada y procedimientos orientados hacia la satisfacción de las necesidades de todos los colombianos”

(Ministerio de Minas y Energía de Colombia, 2011).

2.1.1 Producción de pasturas en el trópico bajo en Colombia, aledaña al corredor petrolífero de Barrancabermeja (Santander).

En Colombia hay 51'008.326 de Ha destinadas a la explotación agropecuaria, de las cuales, 37'185.336 (73%) son destinadas a la parte pecuaria. De estas últimas, 7'198.628 Has (13.8%) están en malezas y rastrojos y los 30 millones restantes están en pastos. Las regiones con mayor participación ganadera son: la norte con el 28% y la oriental con el 27%. Aunque en todos los departamentos del país se evidencia producción ganadera, los departamentos con mayor población son en su orden, Córdoba, Antioquia, Casanare, Caquetá, Cesar, Santander, Meta y Cundinamarca que concentran más del 60% del total (Agronet, 2012).

Las actividades económicas del departamento de Santander se concentran en el sector agrícola y pecuario con el cultivo de la palma de aceite, yuca, maíz, plátano, fique, tabaco, caña, cacao, piña, frijol entre otros y la explotación avícola, caprina y ganadera con proyección a la agroindustrialización de lácteos y cárnicos. Adicionalmente cuenta con la explotación de recursos minerales tales como plomo, uranio, fósforo, yeso, caliza, cuarzo, mármol, carbón, oro, cobre y principalmente petróleo (Plan de Desarrollo Departamental de Santander 2008-2011).

Corredor petrolero en Santander y la vocación ganadera: La ubicación geográfica del Departamento de Santander, dentro del territorio nacional, está caracterizada por su localización estratégica en el área nororiental cuya vecindad con regiones de reconocida vocación ganadera como Cesar, Bolívar, Antioquia y Boyacá, con la confluencia del Valle del Magdalena Medio y beneficiado por las principales rutas nacionales: Vía Panamericana, Central de la Costa y Central del Norte, favorecen la intercomunicación del departamento con la costa y el interior, así como con la vecina República Bolivariana de Venezuela (Gobernación de Santander, 2011). Sin embargo, pese a que es una zona estratégica desde el punto de vista del intercambio y el comercio, eventualmente presenta debilidades y amenazas cuando se trata de la diseminación o introducción de plagas y enfermedades, en las explotaciones agropecuarias, con animales y plantas provenientes de áreas con problemas fitosanitarios endémicos, de la costa norte, región cundiboyacense y de la República Bolivariana de Venezuela (ICA, 2011).

Información proporcionada por Acebedo (2010), menciona cifras de la ganadería del Departamento de Santander en relación a una población de 1.365.807 cabezas dedicadas a explotaciones de cría (33.4%); doble propósito (47.3%) y ceba (19.2%), ubicadas en las seis provincias santandereanas: Soto: 194.882, Guanantá: 127.517, Comuneros 113.300, Vélez (Hoya del Río Suárez): 239.846, García Rovira: 88.198, de Mares (Magdalena Medio): 885.859. Este autor señala como la raza predominante a la Cebú (Brahman) y sus cruces con Holstein, Normando, Pardo Suizo, China Santandereana, Blanco Orejinegro, Simmental, Beefmaster y Santa Gertrudis. Como área dedicada a la ganadería, Santander contempla una extensión de 1.118,318 hectáreas cultivadas en pastos naturales y mejorados en praderas naturales que superan el 50% de la extensión forrajera en el departamento, conformadas especialmente en las siguientes gramíneas: Paja comino (*Homolepsis aturensis*), Maciega (*Paspalum virgatum*), vendeaguja (*Cortaderia nítida*), Bahía o tenza (*Paspalum notatum*) y falsa poa (*Holcus lanatus*).

En relación a los pastos mejorados se destacan, en orden de importancia, las siguientes especies: *Brachiaria* (*humidícola*, *decumbes*, *brisantha*, *mutica*, *arrecta*) ; Puntero (*Hyparrhemia rufa*), Gordura (*Melinis munutiflora*), Estrella (*Cynodon nlemfuensis*), Angleton (*Dichanthium aristatum*), Climacuna (*Dichanthium annulatum*), Guinea (*Panicum maximun*), Carimagua (*Andropogon gayanus*), Raigras inglés (*Lolium perenne*), Alemán

14 Evaluación del estrés abiótico en *Brachiaria spp.* Inducido por bioacumulación de cadmio y plomo, en una zona aledaña al corredor petrolífero de Barrancabermeja (Colombia)

(*Echinochloa polytachia*) Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), Oloroso (*Anthoxanthum odoratum*) (Secretaría de Agricultura de Santander, 2010). Con respecto a las leguminosas establecidas, sobresalen los géneros de *Desmodium* y *Centrosemas* conjuntamente con el Kuzdú (*Pueraria phaseoloides*) las cuales constituyen la mejor participación en las mezclas con las gramíneas naturales y mejoradas (Acebedo, 2010).

En el Municipio de Barrancabermeja, el área rural cubre 52.150 Ha de uso agropecuario, donde el principal uso del suelo lo constituye la ganadería tipo carne (bovina y bufalina) que abarca el 51.7% del área, representado en 26.970 Ha, con un inadecuado uso del suelo donde se ha venido dando un proceso de desalojo de las áreas de cultivo para establecer potreros, resaltándose de esta manera acelerados procesos de incremento de la ganadería con el deterioro del recurso suelo (Martínez *et al.*, 2013). La explotación bovina es en un alto porcentaje de carácter extensivo, con tendencia al sistema de doble propósito entre pequeños y medianos productores y hacia la producción de carne entre los grandes productores (Canchila *et al.*, 2010). El principal sistema de producción es el levante con el 42.1%, en segundo lugar el doble propósito con 17.4%, la ceba se encuentra con 16.5% y el sistema de producción lechero como tal no existe, es muy precario debido a limitantes de carácter técnico-ambientales (Acebedo, 2010).

La explotación bovina es la principal actividad pecuaria que se presenta en Barrancabermeja con una producción total de 43.438 cabezas de ganado bovino, predominando la raza cebú puro para la producción de carne y el cruzado o mestizo. Las principales limitaciones de sanidad animal que afectan la ganadería en esta zona son las intoxicaciones diversas por plantas tóxicas, parasitismo, particularmente los de tipo hemoparasitario y enfermedades de carácter infeccioso como el carbón sintomático y brucelosis (Convenio de Colaboración 017-03 Ecopetrol-Comité de Gremios-Unipaz, 2004, Fedegan, 2013).

El cultivo de pastos tropicales en Colombia: En latinoamérica existen alrededor de 50 millones de hectáreas en pasturas permanentes (Bolívar *et al.*, 1999; CIAT, 2007) de las cuales, aproximadamente el 50% se encuentran en estado avanzado de degradación (Baldomero y Mármol, 2002; CIAT, 2007). El cultivo de pastos en Colombia cobra cada día

mayor importancia. En la actualidad se calcula en más de 40 millones las hectáreas cultivadas, incluyendo 15 millones en pasturas mejoradas, siendo la base principal para el sostenimiento y producción de carne y leche del país (Holmans *et al.*, 2004).

En tiempos cortos, los pastos constituyen el recurso más económico con que cuenta el ganadero y de su eficiencia al cultivarlo y conservarlo depende en gran medida la competitividad de su sistema productivo, evitando incurrir en la compra de alimentos de alto costo. La productividad de los bovinos en el trópico depende de la cantidad y calidad de nutrientes aportados por las especies forrajeras, especialmente *brachiarias*, las más frecuentes en estas praderas; sin embargo, la mayor parte de estas praderas presentan baja eficiencia productiva, con signos evidentes de degradación, ocasionados por las prácticas inapropiadas de manejo tanto en la fase de establecimiento como en su fase productiva (Bernal, 2009).

En las últimas décadas se ha generalizado en varios países de América Central y Sudamérica, en los sistemas de producción ganadera, el uso de gramíneas del género *Brachiaria* como la principal fuente de alimentación de los bovinos; las más distribuidas son: *Brachiaria humidicola*, *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* y *Brachiaria ruziziensis* (Mármol, 2006). Este autor, relaciona varios trabajos del CIAT, en donde menciona que estas plantas forrajeras son muy utilizadas en América tropical, están dentro del género *Brachiaria*, siendo ampliamente conocidas, por poseer excelentes cualidades forrajeras. Sin embargo, también tienen limitaciones especialmente agronómicas, debido a que el mejoramiento genético se ha visto limitado porque estas especies tienen mecanismos apomícticos de reproducción (Miles *et al.*, 2004).

Dinámica productiva de *Brachiaria spp.* Orozco *et al.*, (2012), mencionan que *Brachiaria* es actualmente un género grande que contiene cerca de 100 especies que, aunque distribuidas en todo el trópico, se encuentran principalmente en África (Bernal, 1994). La ecología de estos pastos es diversa, crecen en hábitats caracterizados por pantanos (Noreña, s.f), bosques de sombra ligera y algunas veces en áreas semidesérticas. Yuseika (2010), relaciona la zona de vida de las sabanas tropicales como muy propios de estas especies.

La apomixia identificada en *brachiaria* consiste en que se produce un clon de ella misma y por lo tanto hay polinización en el proceso de formación de semilla sin fecundación (Espinoza *et al.*, 2002, Miles *et al.*, 2004, Pessino *et al.*, 2008). Esto da estabilidad genética a la especie, pero limita cualquier programa de mejoramiento de la misma por la imposibilidad de cruzar por métodos convencionales los progenitores escogidos. No obstante, la identificación de un biotipo sexual de *B. ruzizensis*, ha permitido desarrollar programas de hibridación y mejoramiento genéticos entre especies compatibles de Brachiarias, que han logrado obtener el primer híbrido apomítico comercial de este género, la *Brachiaria híbrido* cv. Mulato. Según Olivera *et al.*, (2009), la capacidad de adaptación de este género se expresa en ciertas características agronómicas, como son: la producción de hojas y pequeños rizomas que facilitan la emergencia de los tallos, su tasa de crecimiento y su alta capacidad para la producción de forraje en condiciones estresantes, que pueden aumentar los rendimientos productivos de la ganadería.

Generalidades de *Brachiaria spp.* Ubicación taxonómica: Según Catasús (1997), ubica a *Brachiaria spp.*, como especies de gramíneas, que pertenecen al reino Cormobionta; división Magnoliophyta; clase Magnoliopsida, subclase Commelinidae; orden Poales; familia Poaceae. Estas especies en particular se encuentran ubicadas en la subfamilia Panicoideae; tribu Paniceae; género *Brachiaria*; son aproximadamente 100 especies que crecen en regiones tropicales y subtropicales de los hemisferios Oriental y Occidental, y se encuentran principalmente en África (Renvoize, 1998). Siete especies perennes de origen africano se han utilizado como forraje en América tropical, Asia, Pacífico Sur y Australia. En la actualidad, *Brachiaria* es el género que contribuye con más materiales forrajeros en el trópico, especialmente en América Central y América del Sur (Pizarro, 2005). La primera introducción de *Brachiaria* en Colombia se remonta a mediados del siglo XIX, cuando *B. mutica* llegó en buques de carga. Desde 1955 se han introducido en Colombia materiales seleccionados de *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola* y *B. dictyoneura*. Según Miles *et al.*, (2004), en 1995 se había sembrado en Colombia aproximadamente 3 millones de hectáreas con especies de *Brachiaria*.

Características morfológicas de especies de *Brachiaria*: Pizarro (2005), afirma que *B. humidicola*, es una planta gramínea perenne y estolonífera de hábito de crecimiento de

semierecto a postrado. Puede alcanzar de 38 a 60 cm de altura, con la presencia de estolones fuertes, largos, de color púrpura, que pueden medir hasta 1,2 m de longitud, los cuales presentan facilidad de producción de hijos en los nudos. Los culmos son erectos, delgados, duros y glabros. Los internodios superiores miden de 8 a 10 cm de longitud y los inferiores de 2 a 3 cm. Estos son de color verde claro y sin vellosidades. Los limbos son lineales, duros, bastos y estrechos, con una coloración de verde a morado (principalmente en los bordes). Los ápices tienden a doblarse por la nervadura central y parecen unir los bordes en las horas de mucho calor o sequía, con una longitud de 10 a 30 cm y de 0,5 a 0,8 cm en su parte más ancha. Estos pueden ser glabros o poco pilosos en la base y la lígula es densamente ciliada. La vaina, de 6 a 20 cm, es de color verde a morado y puede ser desde glabra hasta algo vellosa en los bordes. Las hojas de los tallos vegetativos tienen de 10-30 cm de longitud y de 0,5 a 1,0 cm de ancho. Las hojas de los estolones son de 2,5 a 12,0 cm de largo y de 0,8 a 1,2 cm de ancho. La inflorescencia es en panícula racimosa, corta, de 24 a 45 cm de longitud, con uno a cuatro racimos de 3 a 5 cm de longitud. Espículas uniseriadas bifloras, alternadas a lo largo del raquis, de 5 a 6 cm con pedicelos cortos (Olivera *et al.*, 2006; Anon, 1980).

***Brachiaria decumbens* Stapf cv.** Esta especie se caracteriza por ser una planta herbácea, perenne, semi-erecta postrada, de 30 a 100 cm de altura. Sus raíces son fuertes y duras, con presencia de pequeños rizomas (Portela, 2010). Los culmos, de cilíndricos a ovados, pueden ser erectos o decumbentes, de color verde y algunas veces con visos morados, glabros o pilosos, con la presencia de 6 a 16 internodios de 18 a 28 cm de longitud. Los nudos son de color verde, glabro o poco piloso y con zonas que tienden a ser fuertemente moradas. Las hojas miden entre 20 y 40 cm de largo y de 10 a 20 mm de ancho y están cubiertas por tricomas. Presentan bordes duros y ásperos. Estas son de color verde oscuro, principalmente en el primer año, debido al alto contenido de clorofila. La inflorescencia es en forma de panícula racimosa, de 25 a 47 cm de longitud; está formada por dos a cinco racimos de 4 a 10 cm de largo. Las espículas son oblongo-elípticas, gruesas, de 3 a 4 mm de largo, alineadas en filas dobles y con pedúnculo corto. Las dos glumas, la lema y la palea son de tamaño diferente. La gluma inferior es muy corta y no llega ni a la mitad de la longitud de las espículas; mientras que la superior es casi tan larga como ésta. Las semillas se reproducen a partir del mecanismo de la apómixis y algunas son infértiles, por lo cual el pasto se propaga principalmente por medio de material vegetativo (Pórtela, 2010).

***Brachiaria arrecta* (*B. radicans*) y *Brachiaria mutica*:** ambas especies, se encuentra bien difundidas en el trópico. Ambas especies están estrechamente relacionadas, y se distinguen entre sí, por la disposición de sus espiguillas; en *B. mutica* las espiguillas están generalmente apareadas o agrupadas en el raquis y en *B. arrecta* están solas. El material cultivado de ambas gramíneas es al parecer, uniforme y suele propagarse en forma vegetativa. Ambas especies se adaptan muy bien a suelos pantanosos y por ello que son las mejores gramíneas para estos ambientes tropicales propios del Magdalena Medio Colombiano (Estrada, 2002).

Trabajos realizados por Reyes y otros, en el (2002), relacionaron la rusticidad de *B. arrecta* con suelos de baja y mediana fertilidad y con resistencia a inundaciones con una alta capacidad de extracción y recuperación de nutrientes cuando se abonó con purines.

***Brachiaria arrecta* (Generalidades)**

Nombre Científico: *Brachiaria arrecta* (Hack. ex T. Durand & Schinz) Stent (Missouri Botanical Garden).

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Liliopsida
Orden: Poales
Familia: Poaceae
Tribu: Paniceae
Género: *Brachiaria*
Especie: *arrecta*

Esta especie anteriormente se denominaba *Brachiaria radicans* Napper (FAO, 2012) y cuyo nombre científico es *Brachiaria arrecta* (Hack. ex T. Durand & Schinz) Stent, como sinónimos se encuentran *Urochloa arrecta* (Hack. ex T. Durand & Schinz) Morrone & Zuloaga (USDA-ARS). Las accesiones avanzadas de esta gramínea están en CIAT con la entrada 6020. Borgues *et al.*, (2012) mencionan que esta especie es muy agresiva, se caracteriza por presentar hojas oblongas, con pubescencia en los nudos. Belalcazar *et al.*,

(1995), señalan que *B. arrecta* requiere una alta humedad en el suelo. Noreña (s.f), recomienda manejar esta pastura con 30 días de descanso y puede llegar a soportar 3 unidades animales por hectárea. Entre los nombres vulgares se le conocen en Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Panamá, Perú y Venezuela como pasto Tanner o Tanner Grass, aunque en algunas zonas de Colombia se le conoce como pasto Braquipará.

El origen de esta pastura se localiza en África Tropical en el Este, Sur y de la región meridional (USDA-ARS) su rango de adaptación es amplio en diferentes ecosistemas de las tierras de trópico localizadas a baja altura sobre el nivel del mar en climas muy cálido y preferentemente húmedo desde 0 hasta 1000 m.s.n.m. Los suelos para estas pasturas tienen como características una fertilidad mediana y baja, con texturas arcillosos. Tolera medianamente el estrés por sequía, y sombra y crece muy bien en suelos inundados o pantanosos, se asocia poco con otras pasturas leguminosas (Ferrufino y Vallejo, 1986 y Noreña, sf). Este pasto puede ser atacado fuertemente por plagas como las chinches de los pastos *Aeneolamia spp* (Cardona *et al.*, 2006). El daño lo produce la ninfa que extrae la savia de las raíces y del tallo, tiene el aspecto de saliva o espuma. A su vez, los adultos se alimentan de la savia de la parte superior de las hojas inyectando sustancias tóxicas a la planta, se reconoce el daño severo por el amarillamiento y marchitez de la planta, (Oliveira, 2006). Hay reportes de esta especie como tóxica para el consumo animal por la alta cantidad de nitratos en las hojas (Botero, 1998).

Renvoize *et al.*, (1998) señalan que los usos de esta pastura son variados utilizadas fundamentalmente en pastoreo pero también en corte, acarreo, heno, henolaje, ensilaje y en el control de procesos erosivos (Noreña sf). Descripción morfológica: perenne, tallos próximos a 100 cm, muy decumbentes, enraizadores y ramificados: rizomatosos y estoloníferos, Inflorescencias en panícula con 2 a muchos racimos.

2.1.2 Metales pesados como elementos contaminantes y tóxicos

Diversos autores coinciden que un metal pesado es un elemento químico metálico que tiene una densidad relativamente alta y que es tóxico o venenoso en concentraciones

pequeñas (Nedelkoska y Doran 2003, Chehregani *et al.*, 2005; Yadav *et al.*, 2009, Teopent, 2011).

Srivastava y Majumder (2008), definen como “metales pesados” aquellos elementos químicos que presentan una densidad igual o superior a $5\text{g}/\text{cm}^{-3}$ cuando están en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalino-térreos). Su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0,1% y casi siempre menor del 0,01%. Becerril y otros (2007), mencionan, que el término “metales pesados” es impreciso, porque, es más un referente para indicar aquellos metales que, siendo elementos pesados, son “tóxicos” para la célula. Sin embargo en realidad cualquier elemento que a priori es beneficioso para la célula, en concentraciones excesivas puede llegar a ser tóxico, por lo que es mejor sostener los vocablos “metales pesados” para definir dichos elementos. Navarro y otros (2007), propone que los metales pesados se clasifican en dos grupos: oligoelementos o micronutrientes. Necesarios en pequeñas cantidades para los organismos, pero tóxicos una vez pasado cierto umbral. Incluyen As, B, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Se y Zn. Sin función biológica conocida, mencionan que son altamente tóxicos, e incluyen Ba, Cd, Hg, Pb, Sb, Bi.

Los metales pesados como el Cadmio y el Plomo, implican un riesgo para la salud de los seres vivos porque tienden a ser bioacumulados, esto significa un aumento en la concentración de un producto químico en el organismo vivo en tiempos breves comparado a la concentración del producto químico en el medio ambiente, (Navarro y otros (2007).

Cadmio y Plomo como contaminantes y como tóxicos: Pinto y otros en el (2004), afirman que el metal pesado Cadmio es un elemento no esencial y poco abundante en la corteza terrestre y a bajas concentraciones puede ser tóxico para todos los organismos vivos. La contaminación ambiental por Cadmio ha aumentado como consecuencia del incremento de la actividad industrial que ha tenido lugar a finales del siglo XX y principios del siglo XXI, afectando de forma progresiva a los diferentes ecosistemas. El Cadmio es un contaminante en el medio ambiente y trasciende sobre la salud de todo sistema viviente debido a su persistencia en el sistema aire-suelo-agua-planta-animal y hombre, por su larga vida media biológica (Rodríguez *et al.*, 2008). Una consecuencia de la presencia del

Cadmio en la atmósfera, suelos y seres vivos es la concentración en los alimentos que ocasionan problemas en la salud de los consumidores, como intoxicaciones que pueden evolucionar en formas agudas o crónicas.

El Plomo que es procedente de las gasolinas, se supone que es el 76% de las emisiones de este metal que se deposita en la atmósfera, por lo que este metal tóxico y sus derivados se encuentran en el medio ambiente como: el aire, el agua de consumo, los agroecosistemas vegetales y animales, las fuentes de agua, en el polvo, en el suelo, entre otros (Falcó *et al.*, 2006). En suelos no cultivados se han encontrado de 8 a 20 mg Pb/Kg mientras que en terrenos cultivados puede llegar a encontrarse por encima de 360 mg Pb/Kg y cerca de fuentes de contaminación industrial, el suelo puede alcanzar contenidos de 10g de Pb/Kg o más (Falcó *et al.*, 2006). En áreas rurales, los niveles de Plomo en el aire son del orden de 0,1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ o menos (Gutiérrez *et al.*, 2004). Sin embargo, dependiendo del grado de contaminación, en zonas urbanas las cantidades de Plomo en el aire están comprendidas entre 1 y 3 $\mu\text{g Pb}/\text{m}^3$ y ocasionalmente pueden ser mucho mayores (Gutiérrez *et al.*, 2004).

El peligro de la bioacumulación del Plomo es que este mineral se bioconcentra en plantas y animales y se magnifica a lo largo de la cadena alimentaria (Halliwell *et al.*, 2000). Su uso como aditivo antidetonante en las gasolinas es lo que más ha contribuido a la acumulación de este metal en el medio ambiente (Carrasco *et al.*, 2005).

García (2006), menciona que químicamente hablando el plomo es un ácido débil de Lewis fundamentado en que es una sustancia que sin contener hidrógeno se comporta como un ácido siendo capaz de aceptar un par electrónico mediante la formación de enlaces covalentes coordinados (teoría de Lewis Gilbert Newton, 1875-1946). Esto explica que el plomo presente en el suelo está estrechamente ligado a la materia orgánica de las plantas o con la materia coloidal del suelo o como precipitado. Estudios realizados por Lee *et al.*, (1998), mencionan que la absorción de plomo como metal en el suelo sigue la relación de Langmuir, incrementándose en función del incremento del pH desde 3.0 hasta 8.5. Nikazar y Afshari (2005) investigaron sobre el tema de la adsorción de metales pesados Pb^{2+} , Cd^{2+} y Cr^{4+} sobre paja y salvado de trigo, empleando técnicas de columna observando que la adsorción de estos metales se incrementa en función del aumento del pH, y disminuye cuando se aumenta la temperatura y la velocidad de flujo de la solución. Otros estudios

hechos por Blaylock *et al.*, (1997), mostraron que en suelos con pH entre 5.5 y 7.5 la solubilidad del plomo es controlada por iones fosfatos o precipitados de carbonatos, siendo muy poco el Plomo que está disponible para las plantas incluso aunque éstas presenten la capacidad genética para acumularlo.

El peligro de la contaminación de alimentos o de los propios agroecosistemas radica en los estudios sobre la fitotoxicidad tanto del Plomo como del Cadmio, en cuanto a su capacidad de acumulación y su posibles transmisiones en las redes tróficas, llegando de esta manera a el ser humano (Carrasco, 2006).

Al respecto sobre los peligros en materia de salud, se relaciona información suficiente sobre las implicaciones que representa el Plomo como tóxico (EPA, 2006). Este metal puede penetrar en el organismo por tres vías: respiratoria, digestiva y cutánea, siendo ésta última de escasa entidad (Piola, 1998). El Plomo que atraviesa la piel pasa a través de los folículos pilosos y glándulas sebáceas y sudoríparas directamente al torrente circulatorio. Homan *et al.*, (1988) y Caballero *et al.*, (2002) coinciden en afirmar que en los humanos la absorción de Plomo cuando es por vía inhalatoria es mínima en comparación con la vía digestiva, ambos grupos de investigadores afirman que en casos de penetrar por la vía respiratoria el plomo se combina con proteínas o con el CO₂ espirado, formándose PbCO₃ soluble. Cuando ocurre una intoxicación por vía respiratoria, es posible que se absorba el 40 % del Plomo (Homan *et al.*, 1988). Parte de este Pb se fija en la saliva y se traga, en este sentido la vía respiratoria está considerada como la más peligrosa (Pioloa, 2013). Rubio *et al.*, (2004), indican que los adultos absorben por vía digestiva hasta el 10%, en cambio los niños absorben hasta el 50% del Pb ingerido. Por otra parte, los niños tienden a retener mayor concentración del Plomo absorbido que los adultos, en porcentaje que se puede cuantificar respectivamente en un 30% y 5% (EPA, 2013).

Biodisponibilidad de metales pesados en el suelo y en los sistemas vivientes: La disposición de materiales que contienen metales pesados, en los suelos es de gran interés por sus implicaciones ambientales (Labanowsky *et al.*, 2008). La presencia de metales pesados no sólo se debe a la contaminación antropogénica, sino que, además, existe contribución por meteorización de rocas, al que se denomina nivel basal. Con frecuencia

los metales pesados se encuentran en forma iónica interactuando fuertemente con la matriz del suelo. Estos metales pueden movilizarse y cambiar su forma química debido a cambios en las condiciones medioambientales, entre los que se pueden citar el uso del suelo o la saturación de la capacidad de taponamiento, para Kabata y Pendías (2001), el establecimiento de niveles estándar de elementos traza para la valoración de la contaminación del suelo, constituye el principal requisito de calidad y protección de las funciones agrícolas y ecológicas.

1. La biodisponibilidad de un metal pesado se define como la presencia del mismo en forma de especies iónicas libres que pueden ser absorbidas por las raíces de las plantas y que una vez en las raíces, puede afectar de alguna manera el ciclo de vida de las mismas. También puede definirse como la disponibilidad de un elemento para interactuar con animales, plantas o microorganismos (Dreher, 2013).

Entre los sistemas existentes para la estimación de la contaminación por metales para suelos del Mundo Figuran los contenidos medios "background" y sus intervalos (Zimmerman *et al.*, 2010, Kabata y Pendías, 2004). En Polonia se ha evaluado la contaminación estableciendo cinco clases de polución en suelos: 1) Ligera 2) Moderada 3) Considerable 4) Muy contaminados 5) Extremadamente contaminados. En cada una de estas clases se diferencian tres grupos de suelos según su textura y pH. A su vez, la clase 3, son suelos considerablemente contaminados, presentando un riesgo de contaminación para cosechas (Kabata y Pendías, 2004). La clase 4 corresponde a suelos que no deben usarse para la producción de plantas utilizadas en alimentación, sobre todo si se trata de suelos ácidos y de textura ligera. La clase 5 debería excluirse de cualquier uso agrícola y proceder, dentro de lo posible, a su limpieza.

Holanda ha desarrollado valores estándar para evaluar la calidad del suelo. El valor A se considera de referencia, significa que es desdeñable el nivel de riesgo, por debajo del cual es posible cualquier uso del suelo. Entre los niveles A y C está afectada la calidad del suelo, aunque este no pierde su multifuncionalidad, representa el nivel máximo permitido y hay que considerar su limpieza. Por encima del valor C o valor de intervención se hace necesaria la limpieza de contaminantes. Los valores de referencia propuestos para metales (Cd=0,8; Cu=36; Pb=85; Zn=140) se establecen en función de la fracción arcilla y/o contenido en materia orgánica, y se calculan mediante fórmulas en las que se considera un suelo estándar con 25% de arcilla y 10% de materia orgánica (Vegter, 1995).

Los metales se distribuyen en el suelo entre fracciones con distinto grado de labilidad: cambiables, ligados a materia orgánica, a óxidos de hierro y manganeso y a estructuras minerales. El equilibrio dinámico que se establece entre estas fracciones determina su movilidad y biodisponibilidad, siendo el pH, la cantidad y tipo de coloides del suelo (materia orgánica, arcillas y óxidos) los factores edáficos más importantes en su control (Weng *et al.*, 2001, Mc.Grath *et al.*, 1997). Adicionalmente, la planta puede modificar las condiciones de la rizosfera a través de procesos como la producción de exudados radicales o la alteración del pH (Adamo *et al.*, 2002).

Metales pesados y su relación con las plantas. La colonización vegetal de los suelos ricos en metales depende de la capacidad de las plantas para desarrollar mecanismos de tolerancia, muchas especies toleran elevadas concentraciones de metales en el suelo porque restringen su absorción y/o translocación hacia las hojas (estrategia de exclusión); sin embargo, otras los absorben y acumulan activamente en su biomasa aérea (estrategia acumuladora), lo que requiere una fisiología altamente especializada (Battkle *et al.*, 2008); Labanowski *et al.*, 2008). Por tal razón, las plantas son útiles para conocer los mecanismos de absorción y transporte de Plomo y Cadmio con el fin de acopiar conocimiento sobre la selección y el desarrollo de variedades tolerantes, capaces de aumentar la acumulación de estos elementos en sus tejidos.

Existen diferentes mecanismos por los cuales las plantas toleran altas concentraciones de metales, llamando a estos dos mecanismos como estrategias de acumulación y exclusión (Sun *et al.*, 2008). Estos autores mencionan que la planta en la estrategia acumulativa ésta bioacumula una mayor proporción de contenido total del metal en tejidos diferentes a la raíz, transportándolo a la semilla, a su vez en la estrategia exclusora la planta transporta el metal por el xilema, desde la raíz hasta la hoja, y lo elimina por procesos de volatilización (Battkle *et al.*, 2008).

Algunos reportes sobre contaminantes como el cobre (Cu), Plomo (Pb), zinc (Zn), mercurio (Hg), arsénico (As) tienen la capacidad de provocar cambios evolutivos debido a sus detrimentos significativos en las plantas (Alam *et al.*, 2003, Kapusta *et al.*, 2011). Sus

efectos en las plantas incluyen: necrosis en las puntas de las hojas e inhibición del crecimiento de las raíces, junto con muchas fisiopatías inducidas haciendo que las plantas sean incapaces de tolerar estos metales, generando no sólo estrés para las plantas, sino que se filtran en el sistema de aguas y se introducen en la cadena trófica. En concentraciones pequeñas no suelen tener efectos, pero a medida que se va ascendiendo en la cadena la concentración se va volviendo cada vez mayor (Zimmerman *et al.*, 2010).

Plantas que toleran o utilizan metales pesados. La mayoría de las plantas pueden crecer en suelos con altos contenidos en metales, lo hacen excluyendo iones potencialmente tóxicos de sus sistemas de raíces (Grispen *et al.*, 2006). En otras plantas, los metales son utilizados como micro nutrientes, aunque a menudo aún concentraciones mínimas saturan a la planta (Battke *et al.*, 2008), la habilidad de tolerar la presencia de metales pesados está determinada por el nivel de variación genética de la planta (Moreno *et al.*, 2008). La absorción de los metales por las plantas depende de su biodisponibilidad en el suelo y, particularmente de su reposición a partir de las fracciones menos biodisponibles (Mc Grath *et al.*, 1997).

Los metales se distribuyen en el suelo entre fracciones con distinto grado de labilidad: cambiables, ligados a materia orgánica, a óxidos de hierro y manganeso y a estructuras minerales. El equilibrio dinámico que se establece entre estas fracciones determina su movilidad y biodisponibilidad, siendo el pH, la cantidad y tipo de coloides del suelo (materia orgánica, arcillas y óxidos) los factores edáficos más importantes en su control (Weng *et al.*, 2001, Mc Grath *et al.*, 1997). La colonización vegetal de los suelos ricos en metales depende de la capacidad de las plantas para desarrollar mecanismos de tolerancia (Battkle *et al.*, 2008).

Se han reconocido diferentes grados de acumulación metálica, desde pequeñas elevaciones sobre el nivel de fondo hasta respuestas extremas, en las que el metal llega a exceder el 1% de la materia seca de la planta. Brooks (1998), fue el primero en utilizar el término planta hiperacumuladora para referirse a plantas capaces de acumular >1000 mg Ni kg⁻¹ de materia seca. El término se redefinió posteriormente por (Baker *et al.*, 2000), para designar plantas que acumulaban >10000 mg kg⁻¹ de Mn y Zn, >1000 mg kg⁻¹ de Co, Cu, Ni y Pb y >100 mg kg⁻¹ de Cd en la actualidad, se han identificado aproximadamente

400 especies hiperacumuladoras, de las que la mayor parte son endémicas de suelos serpentínicos y acumulan Ni (Brooks, 1998).

2.1.3 Estrés ambiental en plantas

Según Levitt (1980), desde que aparecieron las plantas se han enfrentado al estrés, abandonaron la vida acuática para pasar a la vida terrestre. Cambiaron sus ambientes originales por otras condiciones ambientales en algunos casos extremas. Este concepto es el estrés, representa un canje en las condiciones para las cuales los organismos deben ajustarse estructural y fisiológicamente con el fin de instalarse, subsistir y luego dejar descendencia, Karnz, (2002), llamo a estos cambios y adaptaciones como razones de sobrevivencia, en función de una especie dentro de un sistema natural (ecosistema) o agrícola (agroecosistema).

El estrés se identifica como una desviación significativa de las condiciones óptimas para la vida. Dichas condiciones determinan cambios en todo los niveles funcionales de los seres vivos (Benavides, 2002). En la biología, el estrés tiene una figuración más amplia, refiriéndose a los cambios ambientales o abióticos que alteran al estado fisiológico de las plantas (Leung *et al.*, 2007).

Basurto y otros (2009), definen el estrés en los vegetales como el conjunto de respuestas bioquímicas o fisiológicas que definen un estado particular del organismo diferente al observado bajo un rango de condiciones óptimas. A su vez (Benavides, 2002) conceptúa que la resistencia al estrés es la capacidad de un organismo para resistir, evitar y escapar a los estímulos ambientales negativos o poder permanecer bajo un estado particular de estrés sin que su fenotipo se vea modificado de manera significativa; es decir su estado "ideal" se identifica al ser observado bajo condiciones óptimas y se denomina "norma". Cornejo en el (2002), analiza algunas manifestaciones fenotípicas de estrés como las deformaciones, amarillamiento, lesiones, necrosis, entre otras. Sin embargo, otros tipo de estrés según este autor son menos obvios como quiera que se debe emplear técnicas especiales para su detección, como la baja asimilación enzimática, inducción a transmisión

de genes, cambios en la composición química, etcétera. Además señala que son múltiples factores ambientales los que inducen estados de estrés en las plantas.

Benavides (2002), conceptúa que un estrés ambiental puede representar una fuerte restricción para el aumento de la productividad en los agroecosistemas y en el aprovechamiento de los recursos naturales, estimando que aproximadamente solo un 10% de la superficie de la tierra arable se encuentra libre de algún tipo de estrés. Autores como Blumm (1998), afirman que cerca del 20% de la tierra presenta algún tipo de deficiencia o toxicidad mineral. El 26% es afectado por estrés de sequía y 15% por temperatura, incluso bajo condiciones de producción protegida, como el uso de invernaderos y túneles, donde también se presentan eventos de estrés biótico o abiótico que disminuye la productividad.

Azcón-Bieto *et al.*, 2000, define un estrés vegetal como la presencia de un factor externo a la planta provocado por el medio ambiente cambiante, que ejerce una influencia negativa sobre su desarrollo óptimo. La respuesta al estrés es cualquier alteración, ya sea estructural o funcional, que se produce en las plantas como consecuencia al estrés.

Los factores estresantes a los cuales están expuestas las plantas pueden ser bióticos y abióticos (Kranz, 2002). Los estreses bióticos son los causados por acción directa de seres vivos (Looney, 1997). La actividad industrial o agrícola produce y libera a la atmósfera y al suelo agentes contaminantes denominados xenobióticos, como el dióxido de azufre (SO₂), óxido de nitrógeno (NO), compuestos clorofluorocarbonados (CFC), herbicidas y metales pesados (Serrato *et al.*, 1991).

Reigosa y Sánchez (2003), consideran que el estrés en los vegetales es "directamente proporcional a la dosis", a condiciones bajas, un agente estresante puede estimular el metabolismo vegetal; sin embargo, a intensidades de 10-100 veces mayores causará daños. Por tanto este autor diferencia dos tipos de estreses en vegetales: Eu-estrés: de carácter activador (positivo), el cual es un estrés suave que estimula el metabolismo de la planta e impulsa el crecimiento. No tiene efectos nocivos y ejerce un factor estimulante para la planta. Por su parte el Dis-estrés es de carácter dañino (negativo), donde el estrés condiciona fuertemente alguna función en la planta y puede alterar el metabolismo normal del vegetal de forma desfavorable, sobrecargando los mecanismos de resistencia de los vegetales y causando daños e incluso la muerte. El autor menciona además que la

transición entre el eu-estrés y el dis-estrés está determinada por "el umbral de tolerancia", que depende tanto de la especie como del tipo de agente estresante y la predisposición de la planta.

Basurto y otros (2009), mencionan los siguientes tipos de estreses por causa ambiental: estrés hídrico, estrés por alta y baja temperatura, estrés por alta y baja irradiación, estrés por alta y baja radiación ultravioleta (UV), estrés por salinidad, estrés nutrimental y estrés por toxicidad de metales pesados.

Estrés por metales pesados en plantas. Bajo el termino metal pesado suelen agruparse todos los metales, excluyendo los alcalinos y alcalinotérreos, cuyo peso específico supera los 5 a 6 gramos cm^{-3} o aquellos que tienen un numero atómico superior a 20 (Benavides, 2002 y Reigosa, 2003). Muchos metales, como el Mn, el Fe, el Zn o el Cu, son esenciales para el desarrollo normal de las plantas ya que son componentes estructurales y catalíticos de proteínas y enzimas. Últimamente se libera al suelo grandes cantidades de metales. El exceso de aquellos y otros como el Al, Cd, Hg, Ni, o Pb, resulta tóxico para las plantas. La fitotoxicidad se manifiesta particularmente en suelos ácidos y afecta tanto el crecimiento, como la formación de raíces laterales y secundarias. La acumulación de Cd o Pb supone un peligro adicional al integrarse en la cadena trófica.

De acuerdo con Weis y Weis., (2004), al analizar las concentraciones de metales en las raíces, estas pueden ser en parte el reflejo de tan solo una proporción de fijación superficial de los metales que no son más que adsorbidos en la superficie de la raíz, en lugar de la bioacumulación interna en sus tejidos. Sin embargo, Vesik y Reichman en el (2009), analizaron la localización de metales en las raíces del Jacinto de agua *Eichhornia crassipes* mediante microanálisis de energía dispersiva de rayos-X, y encontraron que el cobre, Plomo y zinc no fueron localizados en la superficie de la raíz, estando en concentración en el interior tejidos de la raíz. Los niveles fueron más altos en las células de la estela (de los haces vasculares), en gránulos densos de electrones, determinando cantidades significativas de estas estructuras en las paredes celulares. En las raíces de las plántulas de mangle negro, *Avicennia marina*, metales (Cu, Pb y Zn) se concentraron principalmente en las paredes celulares (Mac Farlane and Burchettb, 2002). La epidermis de la raíz sirve

como una barrera para el transporte de Plomo a los tejidos sobre el suelo, pero no el de otros metales. La banda de Caspary endodérmico siempre actúa como una barrera para el movimiento de los tres metales en la estela, (esta estructura es una capa de material impermeable de cera, la suberina y la lignina en las paredes de las células de endodermo de la raíz que impide el paso de agua y otras moléculas), (Weis y Weis, 2004).

Las vacuolas que se encuentran en las células vegetales son regiones rodeadas de una membrana "tonoplasto" o "membrana vacuolar" y llenas de un líquido muy particular llamado "jugo celular". Este orgánulo ocupa un espacio considerable en las células vegetales y es un "Almacén" rodeado por sistemas similares a un filtro de la de la membrana celular. Algunas plantas, actúan como receptoras altamente especializadas con capacidad de acumular elevados niveles de materiales tóxicos, así guardados estos materiales en la vacuola, las células no sufren los efectos tóxicos de estos materiales (Pollard *et al.*, 2008).

Angelova y colaboradores (2004), argumentan que cuando algunas plantas de humedales trasladan metales a partir de tejido de la raíz a los tejidos aéreos, estos se acumulan en las hojas y tallos. El grado de desplazamiento hacia arriba (vertical) depende de la especie de planta, el metal en particular y una serie de condiciones ambientales. Fitzgerald *et al.*, (2003) encontraron que el cobre es acumulado sobre todo en las raíces de las monocotiledóneas y dicotiledóneas, mientras que el Plomo es acumulado principalmente en las raíces de las monocotiledóneas, pero también acumula en los brotes de las dicotiledóneas. En las plantas de *A. tripolium*, el Plomo se acumula mayormente en las raíces con una baja salinidad, mientras que raíces con una alta salinidad, hay presencia de una mayor proporción de Plomo situado hacia los brotes.

Fisiopatías por estrés metalífero. Pandey y Prakash en el (2002), expusieron plantas de repollo a excesos de los cationes Cobalto Co^{2+} , Níquel Ni^{2+} y Cadmio Cd^{2+} , en cultivos hidropónicos utilizando arena, los cuales fueron llevados a una mayor acumulación de los metales (Green Choice Alliance, 2010). Entre los daños fitotóxicos reportados por los investigadores mencionan la inhibición del crecimiento y la inducción de los síntomas visibles de toxicidad de los metales. Como clorosis para Co^{2+} sumada a plantas tratadas que mostraron coloración púrpura rojiza a lo largo de los márgenes de las hojas, para Ni^{2+} plantas tratadas mostraron manchas de color negro cerca de los márgenes de las hojas, y

para Cd^{2+} las plantas tratadas desarrollaron una coloración púrpura a lo largo de los márgenes de las hojas. Cobb y colaboradores (2000), cuantificaron los desechos de las minas mezclados con suelo, buscando expresión de síntomas de metales pesados Plomo, Cadmio, Arsénico y Zinc, en tejidos de lechuga, rábanos cereza Belle, frijoles Roma Bush, y tomate de sala.

Las concentraciones de metales que se encontraron fueron muy heterogéneas sobre las plantas que se cultivaron sobre la mezcla de desechos de la mina y los residuos de suelos enmendados. La lechuga y los rábanos, sobrevivieron en su totalidad en un 100% en el tratamiento de residuos, frente al 0% y el 25% de supervivencia para los tomates y frijoles, respectivamente. Algunos trastornos fisiopáticos por presencia y bioacumulación se relacionan en el cuadro 1.

Fitotoxicidad por Cadmio. Según Wua *et al.*, (2003), la fisiopatías por toxicidad por Cadmio en las plantas son fácilmente identificables, debido a que estos síntomas evidencian retraso en el crecimiento y clorosis generalizada en las hojas que pueden confundirse con una deficiencia de hierro (Yakimova *et al.*, 2007). Estas clorosis se presentan por que el Cd interfiere en la interacción directa o indirecta con la absorción del hierro foliar (Romero *et al.*, 2004). Salt y otros (1995) mencionan que una concentración de Cadmio en el suelo o en el cultivo suprime la absorción de hierro por las plantas. Investigadores como Sandalio *et al.*, (2001) encontraron que en las clorosis inducidas por Cadmio en hojas de maíz podría estar relacionado a cambios en las concentraciones de hierro y a los índices de Zn. Estos investigadores afirman que para el caso de una toxicidad con Cadmio no solo incrementa la deficiencia de fósforo, si no que contribuye a reducir los problemas de transporte de manganeso. En general, se ha demostrado que el Cadmio interfiere con la absorción, el transporte y la utilización de varios elementos como Ca, Mg, P y K, y en el transporte de agua por las plantas. Una toxicidad por Cadmio no puede considerarse sin tener en cuenta la translocación de varios otros elementos esenciales. En el sistema de la planta, se han mostrado efectos tóxicos de Cadmio para ser modificado por elementos esenciales como el Zinc, Calcio, Hierro, Cobre y Manganeso. Además, las proteínas y las vitaminas también se han reportado para alteradas (García, 2006).

Fitotoxicidad por Plomo. Los efectos fitotóxicos por Plomo se expresan de diversas maneras en las plantas en particular ocasionando desordenes fisiológicos y causando muerte celular a altas concentraciones (Yakimova, 2007). Investigadores como Ernest (1998) y Seregin e Ivaniov (2001), mencionan algunos procesos fisiológicos que están afectados como la actividad enzimática, la nutrición vegetal, el potencial hídrico, el estatus hormonal, la estructura de la membrana y el transporte de electrones. Burton *et al.*, (1984) menciona algunos síntomas visuales no específicos y otros síntomas como específicos. Entre los primeros síntomas caracterizados como no específicos se encuentran: una inhibición rápida del crecimiento radical, reducción del área foliar, clorosis y aparición de manchas pardo rojizas fenólicas en los tallos, peciolo y hojas, y necrosis foliar.

Cuadro 1. Alteraciones en plantas por presencia de diferentes metales pesados.

METAL	EFFECTOS
ALUMINIO	Inhibición de la división celular, alteración de la membrana celular y de las funciones a nivel citoplásmico.
ARSÉNICO	Reducción del crecimiento y alteración de la concentración de Ca, K, P y Mn en la planta.
CADMIO	Inhibición de la fotosíntesis y la transpiración. Inhibición de la síntesis de clorofila. Modificación de las concentraciones de Mn, Ca y K.
COBRE	Desbalance iónico, alteración de la permeabilidad de la membrana celular, reducción del crecimiento e inhibición de la fotosíntesis.
CROMO	Degradación de la estructura del cloroplasto, inhibición de la fotosíntesis. Alteración de las concentraciones de Fe, K, Ca y Mg.
MERCURIO	Alteración de la fotosíntesis, inhibición del crecimiento, alteración en la captación de K.
PLOMO	Inhibición del crecimiento, de la fotosíntesis y de la acción enzimática.
ZINC	Alteración en la permeabilidad de la membrana celular, inhibición de la fotosíntesis, alteración en las concentraciones de Cu, Fe y Mg.

Fuente: Yakimova E, Kapchina-Toteva V, Woltering E (2007).

García (2006), afirman que la toxicidad por Plomo inhibe la germinación de las semillas y retarda el crecimiento de las plantas. Los síntomas específicos consisten en una disminución del porcentaje e índice de germinación, de la longitud radical sobre la parte aérea, y del peso seco de las raíces y de la parte aérea.

El efecto fitotóxico del plomo se debe a que su catión divalente Pb^{2+} el cual se une a un oxígeno, a grupos aminos o sulfhídricos, ocasionando estrés iónico debido a su elevado índice de covalencia (Davies, 1995), este autor. Menciona entre los factores que afectan la disponibilidad y absorción de plomo está el tamaño de las partículas del suelo y la capacidad de intercambio catiónico, además de los factores intrínsecos de la planta como la superficie de la raíz, los exudados radicales, los balances hídricos, las tasas de transpiración, los fitosideroforos y como factores extrínsecos la micorrización y los propios sideroforos microbianos.

2.2. Marco legal

Hay un vacío normativo en la legislación vigente respecto a los niveles permisibles para metales pesados en hortalizas y suelo, y no existe norma para la producción sana de pasturas, solo se toman en cuenta algunos productos plaguicidas. A continuación se da una información sobre la legislación consultada para este trabajo:

Ministerio de Salud: Al Ministerio de Salud le compete de acuerdo a la Ley 9 de 1979, establecer las normas para la protección de la salud y de la seguridad de las personas, contra los riesgos que se derivan de la fabricación, almacenamiento, transporte, comercio, uso y disposición de plaguicidas. Le corresponde también emitir concepto sobre la clasificación toxicológica y evaluación del riesgo de toxicidad de los productos plaguicidas para su registro y permiso de uso en Colombia. Igualmente, debe publicar periódicamente las tolerancias oficiales en productos para consumo humano o animal. Sin embargo, mientras se establecen oficialmente límites máximos permisibles para residuos de plaguicidas, se utilizarán los indicados en el Codex alimentario.

Decreto 1594/84 establece las condiciones de calidad para el uso y vertimiento de aguas y en su artículo 40 define los criterios de calidad admisibles para la destinación del recurso para uso agrícola en cuanto a metales pesados, hay que anotar la inexistencia de parámetros para el mercurio y plaguicidas en el agua de riego.

El CODEX Alimentario es un compendio de normas alimentarias aceptadas internacionalmente y presentadas de modo uniforme. El objeto de estas normas es proteger la salud del consumidor y asegurar la aplicación de prácticas equitativas en el comercio de alimentos; contiene también, disposiciones de carácter consultivo en forma de códigos de prácticas, directrices y otras medidas recomendadas, a alcanzar los fines del CODEX. La finalidad de su publicación es que sirva de orientación y fomente la elaboración y el establecimiento de definiciones y requisitos aplicables a los alimentos con miras a su armonización y de esta facilitar el comercio internacional.

Codex alimentarius: El CODEX Alimentario Volumen 2B. Lista de los Límites Máximos para Residuos en Plaguicidas y Límites Permisibles para Residuos Extraños, año 1995

34 Evaluación del estrés abiótico en *Brachiaria spp.* Inducido por bioacumulación de cadmio y plomo, en una zona aledaña al corredor petrolífero de Barrancabermeja (Colombia)

(FAO, Codex Alimentarius Comisión, 1995). Límite máximo para residuos extraños (LMRE), la "LMRE" se aplica a residuos de plaguicidas o contaminantes de procedencia ambiental (incluidos usos agrícolas anteriores) distinta del uso de una sustancia plaguicida o contaminante directa o indirectamente en el producto

Cuadro 2. Límites máximos permisibles para metales pesados y cianuros. Para México

(Private) Límites máximos permisibles para metales pesados y cianuros																				
Parámetros (*) (Miligramos por litro, excepto cuando se especifique)	Ríos						Embalses naturales y artificiales				Aguas costeras				Suelo					
	Uso en riego agrícola (a)		Uso público urbano (b)		Protección de vida acuática (c)		Uso en riego agrícola (b)		Uso público urbano (c)		Explotación pesquera, navegación y otros usos (a)		Recreación (b)		Estuarios (b)		Uso en riego agrícola (a)		Humedales naturales (b)	
	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.
Arsénico	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2
Cadmio	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2	0.05	0.1	0.1	0.2
Cianuro	2.0	3.0	1.0	2.0	1.0	2.0	2.0	3.0	1.0	2.0	2.0	2.0	2.0	3.0	1.0	2.0	2.0	3.0	1.0	2.0
Cobre	4.0	6.0	4.0	6.0	4.0	6.0	4.0	6.0	4	6.0	4	6.0	4.0	6.0	4.0	6.0	4	6.0	4.0	6.0
Cromo	1	1.5	0.5	1.0	0.5	1.0	1	1.5	0.5	1.0	0.5	1.0	1	1.5	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0
Mercurio	0.01	0.02	0.005	0.01	0.005	0.01	0.01	0.02	0.005	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.005	0.01	0.005	0.01
Níquel	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4
Plomo	0.5	1	0.2	0.4	0.2	0.4	0.5	1	0.2	0.4	0.2	0.4	0.5	1	0.2	0.4	5	10	0.2	0.4
Zinc	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20

(*) Medidos de manera total.
P.D. = Promedio Diario P.M. = Promedio Mensual N.A. = No es aplicable
(A), (B) y (C): Tipo de Cuerpo Receptor según la Ley Federal de Derechos.

Fuente: Red de laboratorios de diagnóstico en sanidad acuícola. PRONALSA (2004), www.xoc.uam.mx/pronalsa/tabla3.pdf

Cuadro 3. Niveles internacionales de referencia de metales pesados

Elementos	Rango normal	Concentraciones Anómalas del metal en (ppm)
As	≤ 5-40	Hasta 2500
Cd	≤ 1-2	Hasta 30
Cu	Feb-60	Hasta 2000
Mo	≤ 1-5	10-100
Ni	2-100	Hasta 8000
Pb	10-150	10000 o más
Se	≤ 1-2	Hasta 500
Zn	25200	10000 o más

Fuente: Bowie y Thurston, 1985.

En los (Cuadros 2, 3 y 4) aparece información relacionada con normativas de límites permisibles de metales pesados en contextos agrícolas y de alimentos vegetales. A su vez, se presentan los criterios y estándares para declarar un suelo contaminado, según la normativas internacionales en las (Tabla 1 y 2), con los valores característicos para Cadmio y Plomo, producto de las revisiones de investigadores, centros de investigación y e instituciones certificadas con los sistemas de Salud Pública de Estados Unidos, Reino Unido y la Unión Europea, que fueron recopiladas en el Informe de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía y las Universidades de Granada, Huelva y Sevilla (1999).

Esta revisión es una contribución importante en la medida que integra conceptos como uso del suelo. Según los anteriores compiladores, en el suelo de por sí, se integran diversos grados de peligrosidad para los metales tóxicos, en la medida que la situación represente una situación crítica en un escenario como un parque o jardín donde jueguen niños con tierra; los agroecosistemas de plantas de cultivo de alimento directo para los animales y el hombre, y será mínima para los suelos de las áreas industriales. En resumen estas normas consideran tres tipos básicos de usos del suelo: agricultura, parques naturales y zonas forestales, y por último las zonas industriales.

Tabla 1. Umbrales de contaminación referenciados para Cadmio en diversos escenarios agrícolas, según normativas internacionales

Valores normales (medios o medianas) de referencia para Cadmio en mg/	Escenario o condición agrícola alterada por presencia del metal. Suelos naturales = suelos sin contaminación antrópica. Valor de referencia = valor máximo para suelos normales. Nivel de intervención = suelos a descontaminar. Lodos = lodos residuales de depuradoras.
0,1 µg/L	agua de riego (Azcue, 1993)
0,4 µg/L	agua en el suelo, valor de referencia MTR en Holanda (NMHPPE, 1998)
0,001 mg/L	solución del suelo, nivel tóxico (Bohn <i>et al.</i> 1985)
0,003-0,08	suelos, extraíble con NH ₄ NO ₃ , nivel de referencia en Alemania (Prueb, 1997)
0,01 mg/L	agua de riego, uso continuo, máximo recomendado por US-EPA (Crook y Bastian, 1992)
<0,01-2	suelos agrícolas, rango para USA (Holmgren <i>et al.</i> , 1993)
0,01-0,76	suelos, rango normal para Francia (Baize, 1997)

36 Evaluación del estrés abiótico en *Brachiaria spp.* Inducido por bioacumulación de cadmio y plomo, en una zona aledaña al corredor petrolífero de Barrancabermeja (Colombia)

0,01-7	suelos naturales, rango (Swaine, 1955; Alloway, 1968; Bowen, 1979)
Tabla 1: (Continuación)	
0,01-100	compost para agricultura (Alloway, 1995)
0,03	solución del suelo, nivel tóxico en Suiza (Ewers, 1991)
0,03-0,05	calizas y areniscas (Alloway, 1995)
0,03-0,2	rocas ígneas y sedimentarias (Ross, 1996)
0,04-0,1	enmiendas calizas (Alloway, 1995)
0,05	aguas de riego (Ross, 1996)
0,05	límite de detección para ICP-MS
0,05 mg/L	agua de riego, corto plazo en suelo de pH ³ 7, máximo US-EPA (Crook y Bastian, 1992)
0,05 mg/L	agua potable para ganado, máximo WQC (ESB, 1972)
0,05-0,45	suelos naturales sin anomalías, en Francia (Baize, 1997)
0,1-0,8	estiércol (Alloway, 1995)
0,1-1	suelos agrícolas, rango para Alemania (Kloke, 1980)
0,1-3,2	mamíferos
0,1-2,4	vegetales (Bowen, 1979; Azcue, 1993)
0,13	suelos en Francia (Baize, 1997)
0,15	suelos cultivados, extraíble con HNO ₃ , Rep. Democ. Alemana (Machelett <i>et al.</i> , 1993)
0,2	suelos cultivados, extraíble por HNO ₃ , en USA (Holmgren <i>et al.</i> , 1993)
0,2	suelos en Alemania (Barth y Hermite, 1987)
0,2-41	suelos, rango para el Reino Unido (McGrath y Loveland, 1992)
0,2-139	organismos del suelo, rango (Martin y Coughtrey, 1982)
0,22	suelos cultivados de Francia (Baize, 1997)
0,22	arcillas (Alloway, 1995)
0,26	suelos agrícolas, en USA (Holmgren <i>et al.</i> , 1993)
0,31	suelos cultivados, extraíble por HNO ₃ , en Suiza (Meyer, 1991)
0,41	suelos cultivados, extraíble con agua regia, en Polonia (Ducka, 1992)
0,44	suelos cultivados, República Federal Alemana (Crossman y Wustermann, 1992)
0,45	suelos naturales hidromorfos en Japón (Kitagishi y Yamane, 1981)
0,5	suelos, valor de referencia para Canadá (ICEQC, 1991)
0,7	suelos, valor de investigación en Francia (ASPITET, Baize, 1997)
0,7-2	suelos naturales con moderadas anomalías, en Francia (Baize, 1997)
0,8	suelos, Reino Unido (McGrath y Loveland, 1992)
0,8	suelos, valor de referencia en Holanda (NMHPPE, 1994)
0,8	suelos, valor de referencia en Bélgica (BVRHABTGG, 1995)
0,8	suelos, extraíble por HNO ₃ , nivel máximo para Suiza (Baize, 1977)
<1-240	arcillas, rango (Alloway, 1995)
<1-3410	lodos, rango de los utilizados en agricultura (Alloway, 1995)

1	suelos, en RU (Barth y Hermite, 1987)
1	suelos, nivel máximo con pH<7 para aplicar lodos en España (BOE 1/10/90)
1	suelos, valor de referencia N1 en Galicia (CICDXI.XG, 1997)
1-3	suelos, ligera contaminación, clase 1 del GLC del RU (Kelly, 1979)
Tabla 1: (Continuación)	
1-3	suelos, nivel máximo para aplicar lodos en la UE (McGrath <i>et al.</i> , 1994)
1,6	suelos, nivel máximo para aplicación de lodos en Canadá (Sheppard <i>et al.</i> , 1992)
2	límite de detección para Espectroscopia de absorción atómica
2	suelos, nivel de intervención, parques y agricultura en Bélgica (Adriano <i>et al.</i> , 1997)
2	suelos, nivel máximo para aplicar lodos en Francia (AFNOR NF U 44-041, 1985)
2	suelos, valor de referencia en Francia (Barth y Hermite, 1987)
2	suelos, nivel de anomalía para los suelos de Francia (Godin, 1983)
2-7	suelos naturales con fuertes anomalías, en Francia (Baize, 1997)
2,5	suelos, extractos DTPA, nivel de toxicidad (Chang y Broadbent, 1981)
3	suelos, nivel máximo para aplicar lodos en Reino Unido (Ross, 1996)
3	suelos, valor de referencia en Alemania (Barth y Hermite, 1987)
3	suelos, nivel máximo "trigger" para jardines en Reino Unido (ICRCL, 1987)
3	suelos agrícolas, nivel de intervención para Alemania (Kloke, 1980)
3	suelos, nivel máximo con pH>7 para aplicar lodos en España (BOE 1/10/90)
3	suelos, nivel de intervención para agricultura en Canadá (Sheppard <i>et al.</i> , 1992)
3,5	suelos, valor de referencia en RU (Barth y Hermite, 1987)
3-8	suelos, nivel tóxico (Kabata Pendias y Pendias, 1984)
3-10	suelos, contaminación moderada, clase 2 del GLC del RU (Kelly, 1979)
4	límite de detección para fluorescencia de rayos X
4	suelos, nivel de intervención para áreas residenciales, Ontario (Sheppard <i>et al.</i> , 1992)
10	suelos, nivel de tratamiento en Francia (Godin, 1983)
10-50	suelos, contaminación fuerte, clase 3 del GLC del RU (Kelly, 1979)
12	suelos, nivel de intervención en Holanda (NMHPPE, 1994)
12	suelos, nivel ecotoxicológico (Van der Berg, 1993)
15	suelos, nivel máximo "trigger" para parques y zonas recreativas RU (ICRCL, 1987)
15	suelos, nivel de intervención para áreas recreativas en Bélgica (Adriano <i>et al.</i> , 1997)
20	suelos, nivel máximo para aplicar lodos en USA (McGrath <i>et al.</i> , 1994)
20	lodos, nivel máximo para aplicar a suelos con pH<7 en España (BOE1/10/90)
20	suelos, nivel de urgencia para Francia (Godin, 1983)
20-40	lodos, nivel máximo para agricultura en la UE (Alloway, 1995)
30	suelos, nivel de intervención para áreas industriales en Bélgica (Adriano <i>et al.</i> , 1997)
35	suelos, umbral de toxicología humana (Van der Berg, 1993)
40	lodos, nivel máximo para aplicar a suelos con pH>7 en España (BOE1/10/90)
>50	suelos, contaminación inusualmente fuerte, clase B del GLC del RU (Kelly, 1979)
85	lodos, nivel máximo para agricultura en USA (Alloway, 1995)

Fuente: Consejería de Medio Ambiente de La Junta de Andalucía, 1999. Adaptado por Peláez, 2013

38 Evaluación del estrés abiótico en *Brachiaria spp.* Inducido por bioacumulación de cadmio y plomo, en una zona aledaña al corredor petrolífero de Barrancabermeja (Colombia)

Tabla 2. Umbrales de contaminación referenciados para Plomo en diversos escenarios agrícolas, según normativas internacionales

Valores normales (medios o medianas) de referencia para Cadmio en mg/	Escenario o condición agrícola alterada por presencia del metal.
	Suelos naturales = suelos sin contaminación antrópica. Valor de referencia = valor máximo para suelos normales. Nivel de intervención = suelos a descontaminar. Lodos = lodos residuales de depuradoras.
0,001 mg/L 3 µg/L 11 µg/ 0,003-3 0,03	solución del suelo, nivel tóxico (Bohn <i>et al.</i> 1985) agua de riego (Azcue, 1993) L agua en el suelo, valor de referencia MTR en Holanda (NMHPPE, 1998) suelos, extraíble con NH ₄ NO ₃ , nivel de referencia en Alemania (Prueb, 1997) límite de detección para ICP-MS
0,1 mg/L 0,1-120 0,2-20 0,2-30 1	agua potable para ganado, máximo WQC (ESB, 1972) suelos agrícolas, rango para Alemania (Kloke, 1980) vegetales (Bowen, 1979; Azcue, 1993) mamíferos (Azcue, 1993) solución del suelo, nivel tóxico en Suiza (Ewers,1991)
1,1-27 1,3-2240 2 2-200 2-300	estiércol (Alloway, 1995) compost para agricultura (Alloway, 1995) límite de detección para fluorescencia de rayos X suelos naturales (Allaway, 1968; Bohn <i>et al.</i> 1985) suelos naturales (Swaine, 1955; Bowen, 1979)
2-93 3 3 3-16338 5 mg/L	suelos, rango normal para Francia (Baize, 1997) basaltos (Alloway, 1995) suelos, extraíble con NH ₄ NO ₃ , nivel de intervención en Alemania (Prueb, 1997) suelos, rango para el RU (McGrath y Loveland, 1992) agua de riego, uso continuo, máximo recomendado por US-EPA (Crook y Bastian, 1992)
5,5 5,7 7-225 7,5-135 9-50	suelos, extractos DTPA, nivel de toxicidad (Chang y Broadbent,1981) calizas (Alloway, 1995) fertilizantes (Ross, 1996; Alloway, 1995) suelos agrícolas, rango para USA (Holmgren <i>et al.</i> , 1993) suelos naturales sin anomalías, en Francia (Baize, 1997)
10 10 10 10 11	suelos naturales (Allaway, 1968) areniscas (Alloway, 1995) corteza terrestre (Bohn et al. 1985) mg/L agua de riego, corto plazo en suelo de pH≥7, máximo US-EPA (Crook y Bastian, 1992) suelos cultivados, extraíble por HNO ₃ , en USA (Holmgren <i>et al.</i> , 1993)

Tabla 2:	(Continuación)
12,3	suelos agrícolas, en USA (Holmgren et al., 1993)
14-15	corteza terrestre (Alloway, 1995; Baize, 1997)
14	serpentininas y peridotitas (Alloway, 1995)
15	límite de detección para Espectroscopía de absorción atómica
17	suelos cultivados, extraíble con HNO ₃ , Rep. Democ. Alemana (Machelett <i>et al.</i> , 1993)
18,8	suelos cultivados, extraíble con agua regia, en Polonia (Ducka, 1992)
<20	agua de riego (Ross, 1996)
20-1250	enmiendas calizas (Alloway, 1995)
20,4	suelos, extractos HNO ₃ , nivel de toxicidad (Chang y Broadbent, 1981)
22,6	suelos cultivados, extraíble por HNO ₃ , en Suiza (Meyer, 1991)
22-34	suelos, valor de referencia N1 en Galicia (CICDXI.XG, 1997)
23	arcillas (Alloway, 1995)
24	granitos (Alloway, 1995)
29	suelos naturales hidromorfos en Japón (Kitagishi y Yamane, 1981)
30	suelos en Alemania (Barth y Hermite, 1987)
30-300	vegetales contaminados (Kabata Pendias y Pendias, 1984)
36	suelos cultivados, República Federal Alemana (Crossman y Wustermann, 1992)
40	suelos, valor de referencia en Bélgica (BVRHABTGG, 1995)
50	suelos, nivel máximo con pH<7 para aplicar lodos en España (BOE 1/10/90)
50	suelos en RU (Barth y Hermite, 1987)
50	suelos, extraíble por HNO ₃ , nivel máximo para Suiza (Baize, 1977)
50-300	suelos, nivel máximo para aplicar lodos en la UE (McGrath <i>et al.</i> , 1994)
60	suelos, nivel máximo para aplicación de lodos en Canadá (Sheppard <i>et al.</i> , 1992)
60	suelos, nivel de investigación en Francia (ASPITET, Baize, 1997)
60-90	suelos naturales con moderadas anomalías, en Francia (Baize, 1997)
85	suelos, valor de referencia en Holanda (NMHPPE, 1991)
100	suelos, valor de referencia en Alemania (Barth y Hermite, 1987)
100	suelos, nivel de anomalía para los suelos de Francia (Godin, 1983)
100	suelos, nivel de intervención en Italia (GRER, 1996)
100	suelos agrícolas, nivel de intervención para Alemania (Kloke, 1980)
100	suelos, nivel máximo para aplicar lodos en Francia (AFNOR NF U 44-041, 1985)
100-400	suelos, nivel tóxico (Kabata Pendias y Pendias, 1984)
100-3000	suelos naturales con fuertes anomalías, en Francia (Baize, 1997)
200	suelos, nivel de intervención, parques y agricultura en Bélgica (Adriano <i>et al.</i> , 1997)
200	suelos, nivel de investigación en Francia (Godin, 1983)
290	suelos, nivel ecotoxicológico (van der Berg, 1993)
300	suelos, umbral de toxicología humana (van der Berg, 1993)
300	suelos, nivel máximo con pH>7 para aplicar lodos en España (BOE 1/10/90)
375	suelos, nivel de intervención en agricultura en Canadá (Sheppard <i>et al.</i> , 1992)

40 Evaluación del estrés abiótico en *Brachiaria spp.* Inducido por bioacumulación de cadmio y plomo, en una zona aledaña al corredor petrolífero de Barrancabermeja (Colombia)

400	suelos, nivel de intervención para áreas residenciales en Bélgica (Adriano <i>et al.</i> , 1997)
Tabla 2:	(Continuación)
500	suelos, nivel máximo "trigger" para jardines en RU (ICRCL, 1987)
500	suelos, nivel de intervención para áreas residenciales en Ontario (Sheppard <i>et al.</i> , 1992)
500	suelos, nivel de tratamiento en Francia (Godin, 1983)
530	suelos, nivel de intervención en Holanda (NMHPPE, 1991)
550	suelos, valor de referencia en RU (Barth y Hermite, 1987)
750	lodos, nivel máximo en lodos para aplicar a suelos con pH<7 en España (BOE1/10/90)
750-1200	lodos, nivel máximo para agricultura en la UE (Alloway, 1995)
840	lodos, nivel máximo para agricultura en USA (Alloway, 1995)
1000	suelos, nivel de intervención para áreas comerciales en Ontario (Sheppard <i>et al.</i> , 1992)
1000	suelos, nivel de urgencia para Francia (Godin, 1983)
1200	lodos, nivel máximo en lodos para aplicar a suelos con pH>7 en España (BOE1/10/90)
1500	suelos, nivel de intervención para áreas recreativas en Bélgica (Adriano <i>et al.</i> , 1997)
2000	suelos, nivel máximo ("trigger") para parques y zonas recreativas RU (ICRCL, 1978)
2500	suelos, nivel de intervención para áreas industriales en Bélgica (Adriano <i>et al.</i> , 1997)

Fuente: Consejería de Medio Ambiente de La Junta de Andalucía, 1999. Adaptado por Peláez, 2013

El cuadro 4. Aparece información relacionada con los niveles de referencia, de investigación, de investigación recomendable, de investigación obligatoria y de intervención, sugeridos por la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía (1999). Este informe es un referente internacional en materia de normatividad vigente de contaminantes como los metales tóxicos Cadmio y Plomo, en los suelos agrícolas, donde la junta define tres niveles en relación a los grados de acidez, neutralidad y alcalinidad de los suelos:

Nivel de referencia: representa el máximo valor admisible para los suelos no contaminados. Normalmente se calcula por el percentil del 90 de los valores correspondientes a los suelos naturales, no contaminados. Indica que el 90% de los suelos presentan valores inferiores a él. Para este umbral se debe conocer el pH del suelo y el contenido total de As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, Se, Sn, Tl y Zn.

Nivel de investigación: en este nivel los suelos se encuentran contaminados y se proponen una serie de determinaciones para evaluar la posible toxicidad de la contaminación. Se establecen dos niveles de peligrosidad.

Nivel de investigación recomendable: es el nivel de alerta a partir del cual se sospecha que puede existir una contaminación peligrosa. A este nivel se recomienda realizar una serie de determinaciones para precisar la posible toxicidad de la contaminación (además de las determinaciones reguladas en el nivel anterior):

- **Parámetros del suelo:** textura, contenidos en materia orgánica, carbonatos y óxido-hidróxidos de Fe libre.
- **Elementos traza.** Se recomienda determinar el contenido de metales solubles en agua y extraíbles por EDTA.

Nivel de Investigación obligatoria: se supone que a partir de este umbral el suelo se encuentra contaminado y se establece la obligatoriedad de investigar adecuadamente esta contaminación. Se han de realizar con carácter obligatorio todas las determinaciones referidas en el umbral anterior. Además se recomienda la extracción secuencial propuesta por Tessier *et al.*, (1979).

Nivel de intervención: se admite que el suelo se encuentra contaminado a niveles peligrosos y es procedimiento urgente su remediación

Cuadro 4. Niveles de Umbral y de intervención para contaminación para Cadmio y Plomo.

Umrales propuestos para los metales Cadmio y Plomo en Suelos Agrícolas			
Concentraciones totales de los metales expresados en mg/kg.	Tipología de nivel	Intervalos de pH	
		pH<7	pH>7
Cadmio	Nivel de referencia	<2	<3
	Nivel de investigación recomendable	2-3	3-5
	Nivel de investigación obligatoria	3-7	5-10
	Nivel de intervención	>7	>10
Plomo	Nivel de referencia	<100	<200
	Nivel de investigación recomendable	100-250	200-400
	Nivel de investigación obligatoria	250-350	400-500
	Nivel de intervención	>350	>500

Fuente: Consejería de Medio Ambiente de La Junta de Andalucía, 1999.

2.3 Antecedentes

En el mundo no son muchos los trabajos relacionados con seguimiento a bioacumulación de metales pesados, y los tipos de estreses que puedan generarse. Sin embargo, es importante anotar los trabajos realizados en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Recinto Universitario de Mayagüez, donde han estudiado la vegetación como bioindicadora de disturbios ambientales y riesgos para la salud de los residentes. Massol-Deyá, A. y E. Díaz (2001), determinaron bioconcentración de metales tóxicos en la vegetación de la zona civil de Vieques, Puerto Rico. En general, los investigadores observaron acumulación de Plomo, Cadmio, Manganeso, Níquel, cromo y otros elementos en la vegetación de Vieques en niveles superiores a los detectados en otros ecosistemas de Puerto Rico.

Molino (2012), evaluó la presencia de metales pesados en suelos, pasturas y leche bovina, en áreas agrícolas expuestas a emisiones de actividades industriales en la zona lechera de Ceres en la Provincia de Santa Fe en Argentina, indicando en estas investigaciones como los procesos que participan en la dispersión e incorporación de los metales como el Plomo, el Cadmio, el cobre y el zinc, se encuentran en distintos niveles de la cadena trófica, la investigación arrojó resultados en cuanto a los términos cuantitativos de la concentración de estos metales en la leche cruda de bovinos, la cual comparo con la reglamentación internacional.

Hernández y colaboradores en el 2008, investigaron los contenidos de metales pesados en especies de gramíneas que crecían en ecosistemas desarrollados en emplazamientos de minas abandonadas, y comparaban con los que presentan esas mismas especies al crecer en las cubiertas de vertederos sellados y, donde tenían en cuenta los niveles que se alcanzan en esas mismas plantas al crecer en suelos de escenarios que no sufren contaminación, pero situados en los mismos entornos ambientales. Trabajos realizados por Pastor y Hernández (2009) en pasturas de zona templada y que se encontraban establecidas en antiguas minas de Calcopirita en España, concluyeron que estas especies de pastos en su mayoría bioacumulan más de dos metales tóxicos afectando por consiguiente la biodiversidad vegetal, en relación a las cercanías hacia las fuentes de

contaminación. Estos investigadores plantean la preocupación de que una tolerancia de estos vegetales a los contaminantes tóxicos perjudica directamente la red trófica.

En Colombia, trabajos desarrollados por Arroyave y colaboradores en (2010), demostraron la transferencia de mercurio y Cadmio desde el sistema suelo hacia *Brachiaria dictyoneura* en función de la capacidad bioindicadora y bioacumuladora. Durante la evaluación de Cadmio en *B. dictyoneura*, observando una disminución en el crecimiento del 65%. Los investigadores correlacionaron la toxicidad de Cadmio, con la acumulación consecutiva del catión durante el tiempo de monitoreo. En relación, con el tratamiento con mercurio, a partir de los 30 días de exposición, se observó disminución en el contenido del catión en la planta, presentando posiblemente fitorreducción de mercurio Hg^{2+} a Hg° y posterior evaporación.

Capítulo 3

RESULTADOS

3.1. ESTIMACIÓN DE FRECUENCIAS DE GÉNERO *Brachiaria* EN CAMPO Y SUS CONTENIDOS BIOACUMULADOS DE CADMIO Y PLOMO, EN TEJIDOS VEGETALES DE RAÍZ, TALLO Y HOJAS

RESUMEN

En el Magdalena Medio en Colombia confluyen en los mismos sitios dos actividades económicas: una ganadería intensiva y una consolidada industria petroquímica. Esto propicia en detrimento directo en contra de la primera (industria de cárnicos) e indirectamente en la Salud Pública, un peligro latente por la alta incidencia de efluentes como los metales pesados tóxicos Cadmio y Plomo que contaminan estos suelos. Se realizó un inventario de pasturas en esta región en transectos a 100, 500, 2500 y 5000 metros, a partir de los focos de contaminación discriminados como Pozos en Yondó (Antioquía), Refinería de crudo y el Campus académico de la Universidad de la Paz, estos dos últimos en la ciudad de Barrancabermeja (Santander).

Se tomaron muestras vegetales y de suelo aledaño por triplicado mediante cuadrantes anidados, a profundidades de 5 y 30 centímetros. La persistencia de los metales en suelo y su bioacumulación en las plantas se determinaron por espectrometría de absorción

atómica en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. El impacto sobre la diversidad y riqueza se interpretó con los indicadores de Shannon y Simpson, y la contaminación antrópica se analizó con métodos estadísticos multivariados de componentes principales.

Los resultados destacaron, una alta frecuencia de representantes de la familia Poaceae y de sus géneros de *Brachiaria spp.*, para los doce segmentos explorados, con una varianza explicada en los tres primeros componentes de 78,122%, donde variables como persistencia de Cadmio y Plomo a 5 y 30 centímetros de profundidad del suelo respectivamente, presentaron mayor peso, en la relación transectos-foco de contaminación.

Una vez estimado la mayor frecuencia en géneros de *Brachiaria*, se prosiguió el estudio solo con estas especies de pastura. Se determinó los contenidos de Cadmio y Plomo en diferentes tejidos vegetales (raíces, tallos y hojas), para los géneros de *Brachiaria* encontrados en cada corredor inventariado.

La información se interpretó con base en análisis multivariados de componentes principales (PCA), mostrando que la varianza fue explicada en los tres primeros componentes, donde las variables con mayor peso fueron la profundidad del suelo a 5 y 30 centímetros; tipo de pastura con predominio de las especies introducidas y el transecto en relación a la distancia focal de las fuentes de contaminación.

Se concluyó para esta primera fase de la investigación lo siguiente:

Que el monocultivo de *Brachiaria spp.* Adaptado a estos suelos degradados por metales pesados impacta negativamente la diversidad y riqueza. Así mismo, estas pasturas bioacumulan Cadmio y Plomo en el decreciente siguiente: raíces>tallos>hojas.

Palabras claves: estrés abiótico, Cd y Pb, pasturas mejoradas, contaminación antrópica, Cadmio y Plomo, *Brachiaria spp.*

ABSTRACT

In the Middle Magdalena in Colombia two economic activities: intensive livestock and petrochemical industry consolidated. This creates direct detriment against the meat industry and indirectly to Public Health, a latent danger from the high incidence of effluents toxic heavy metals as cadmium and lead that pollute these soils. An inventory of pastures in this region in transects 100, 500, 2500 and 5000 meters from the pollution sources such as wells in Yondó (Antioquia), oil refinery and the academic campus of the Universidad de la Paz, the latter two in the city of Barrancabermeja (Santander).

Plant sampled and adjacent land triplicate by nested quadrants at depths of 5 and 30 centimeters. Persistence of metals in soil and bioaccumulation in plants were determined by atomic absorption spectrometry in the laboratory of Plant Physiology, National University of Colombia in Palmira. The impact on the diversity and richness was interpreted with Shannon and Simpson indicators and anthropogenic pollution was analyzed with multivariate statistical methods of principal component.

The results highlighted, a high frequency of Poaceae family representatives and their genres of *Brachiaria spp.* for the twelve segments explored, with an explained variance in the first three components of 78.122%, where variables such as persistence of cadmium and lead at 5 and 30 cm soil depth respectively, had greater weight in the relationship transect-source of contamination.

Having estimated the highest frequency in *Brachiaria* genres, the study was continued only with these tropical pasture species. We determined the contents of cadmium and lead in different plant tissues (roots, stems and leaves) for *Brachiaria* genres found in each corridor inventory.

The information is interpreted based on principal component multivariate analysis, showing that the variance was explained in the first three components, where more weight variables were soil at 5 and 30 centimeters of depth, type of pasture species predominantly transect introduced and in relation to the focal distance of the sources of contamination.

The conclusion for this first phase of the research is the following:

That *Brachiaria* monoculture. Adapted to these soils degraded by heavy metals negatively impacts the diversity and richness. Also, these pastures bioaccumulate Cadmium and Lead by high to low as follows: roots> stems> leaves.

Keywords: abiotic stress, Cd and Pb, improved pastures, anthropogenic pollution, cadmium and lead, Brachiaria spp.

3.1.1 Marco teórico

“La estadística es la ciencia según la cual si una persona come dos pollos y otra ninguno, se deduce que cada una se ha comido un pollo”.

Umberto Eco

- **Frecuencias de pasturas tropicales adaptadas a suelos metalíferos.** Levêque (1994), comenta que desde 1992, muchos países suscribieron el programa ambiental: “Estrategia de Biodiversidad Mundial” en Rio de Janeiro, donde se fijaron las políticas nacionales e internacionales de conservación de la naturaleza, solo con un sentido el de promover la biodiversidad, y muy particularmente en el contexto de trópico. Para este autor la biodiversidad representa la esencia de la diversidad del mundo vivo, este se manifiesta en niveles desde los genes intraespecíficos (diversidad genética), especies (diversidad interespecífica) y ecosistemas (diversidad ecológica).

En la agronomía el concepto de biodiversidad es asimilado muy estrechamente como quiera que son muy pocas las especies cultivadas para la seguridad alimentaria o la seguridad agroindustrial Hernández y Pastor (2008a). Pero para la epidemiología vegetal y ambiental, la biodiversidad cobra un sentido más amplio, abarcando nociones diferentes como la diversidad específica, la rareza, el carácter natural, la fragilidad, que sugieran medidas de protección integrada en una gestión ambiental y de sus componentes agroecosistémicos (Levêque, 1994, Hernández y Pastor, 2008 b).

Dado que la definición del concepto mismo de diversidad ecológica y biológica, interpretada desde el un campo de aplicación, es poco clara y es objeto de múltiples interpretaciones, la manera de medir la biodiversidad sigue siendo también una cuestión abierta. Sin embargo autores como Rondeux *et al.*, (1996), consideran como necesarias informaciones fiables sobre el estado y la evolución o la dinámica de la diversidad de los componentes florísticos (coberturas vegetales) con miras a la gestión sostenible, por lo tanto esto involucra nuevos enfoques dirigidos hacia los inventarios vegetales, en función de contextos antropogénicos en que se desarrollen.

Para el caso colombiano que guarda todo un recorrido de movimientos de infraestructura y operación petrolera en la región del Magdalena Medio, donde sus culturas han tenido un contacto histórico y permanente con estos recurso no renovable desde los albores de las culturas indígenas Yariguíes que poblaron y se desarrollaron en el Valle Magdalénico en los manaderos naturales cercanos a Barrancabermeja sobre el río Oponcito (Avellaneda, 1998). Aparece esta región como la primera entre otras, que se arraigaron como tradición energética en un importante periodo en un siglo de explotación petrolera, contribuyendo a la transformación de los paisajes naturales por la dinamización de la colonización y formación de pueblos y regiones, que se han abierto llevándose tras de sí a decenas de culturas indígenas e introduciendo patrones extractivos, que a la postre han contribuido a la degradación del medio ambiente y de los paisajes, como lo señala este mismo autor.

La contaminación ambiental generada por explotación de un recurso no renovable como el petróleo, ocasiona una alta emisión de tóxicos como los metales pesados que con el paso del tiempo afectan la sanidad de diferentes agroecosistemas con repercusiones en toda la red trófica (Hernández *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2007). Estas industrias extractivas originan persistencia y acumulación de metales pesados como Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Plomo (Pb), Vanadio (V), Zinc (Zn), Mercurio (Hg) y Molibdeno (Mo) entre otros, en suelos y en poblaciones animales y vegetales.

La región del Magdalena Medio no solo es reconocida por sus actividades extractivas y de refinamiento de crudo. También es conocida por sus vocaciones ganaderas especialmente bovinas y caprinas, con enlaces comerciales de la cadena de cárnicos en buena parte del

país. Los agroecosistemas más establecidos son las pasturas tropicales, que se caracterizan por una alta población de gramíneas que son especies que se han adaptado a estos suelos metalíferos con un alto contenido de Aluminio (Casierra, 2002), sin embargo no son muchos los trabajos donde se mencionen que niveles de acumulación de metales puedan presentar estas poblaciones vegetales y su significado ecológico-funcional en el trópico, en la medida que relacione estrés y adaptación, en referencia a niveles de organización, gradientes ambientales, tolerancia y adaptación (Sullivan, 1999).

Es necesario conocer los estados del arte en función de los espacios y entornos ecológicos de escenarios que por muchos años han estado vulnerables por presiones antropogénicas, y hacernos preguntas oportunas: ***¿Por qué estudiar la pertinencia misma de inventarios de pastizales en un contexto petrolífero y agrícola, donde se presenta históricamente altas emisiones de metales pesados, y cómo estas actividades traspasan la biodiversidad en estas poblaciones vegetales?*** A estas preguntas trata de responder el desarrollo del presente capítulo en su primera parte.

Respuestas parciales las encontramos en los trabajos de Hernández y Pastor (2008a), quienes investigaron la presencia de altos contenidos de metales pesados en especies de gramíneas que crecían en ecosistemas desarrollados en emplazamientos de minas abandonadas en España, y las comparaban con los que presentan esas mismas especies al crecer en las cubiertas de vertederos sellados donde tenían en cuenta los niveles que se alcanzan en esas mismas plantas al crecer en suelos de escenarios que no sufren contaminación, pero situados en los mismos entornos ambientales.

- **Contenidos de Cadmio y Plomo en tejidos vegetales de *Brachiaria spp.*** El territorio que comprende el Valle del Magdalena Medio en Colombia, sobre las inmediaciones a la estatal petrolera ha sido muy presionado por el desarrollo de una industria petroquímica con detrimento hacia la seguridad ambiental, entendida esta como la relación armoniosa entre las actividades antrópicas, el desarrollo de los proyectos, la evolución de los ecosistemas y la Salud Pública de las comunidades asentadas en dichos polos de desarrollo. Autores como Avellaneda (1998), han discutido abiertamente la sustentabilidad ambiental de una industria como la del petróleo, sobre la base de problematizar estas

interacciones proyecto-ambiente y conservación de los ecosistemas, en términos de ofertas y potencialidades ambientales, y la capacidad de resiliencia de los propios ecosistemas y sus comunidades bióticas.

En epidemiología agrícola hay analogías entre los factores de riesgo ambiental, y predisposición a enfermedades en poblaciones vegetales (Porta, 2008), entre estos la presencia de un metal pesado (xenobiótico) sin funcionalidad biológica y que altera la fisiología de la planta y que tiene consecuencias sobre la morbilidad, en razón de la casuística de los procesos de salud en los agroecosistemas (endemismos multiplex) (Bophal, 2008). En tal sentido la misma epidemiología vegetal puede extenderse al estudio y cuantificación de la presencia y efectos de estos factores de predisposición a epidemias en una población de plantas y medir sus repercusiones sobre las redes tróficas (sistema integral de inspección en epidemiológica agrícola, ambiental y de Salud Pública), en programas de vigilancia epidemiológica definida como un servicio de importancia cuyo fin sea decidir con bases objetivas o científicas, sobre acciones en el tiempo a fin de controlar o prevenir un problema de salud evidente (Romero *et al.*, 2007).

Las pasturas de *Brachiaria* spp, fueron introducidas, mejoradas y liberadas por los sistemas de disciplinas de mejoramiento genético de centros de investigación tanto nacionales como internacionales, por sus excelentes cualidades forrajeras como tolerancia a estreses abióticos entre otros: las sequías, las bajas fertilizaciones, los suelos ácidos y los excesos de humedad (Canchila *et al.*, 2010). Sin embargo, hay un vacío en el conocimiento relacionado con estrés por presencia y bioacumulación de metales pesados tóxicos en estos agroecosistemas forrajeros, a nivel de trópico, cuando existe un factor predisponente como es una actividad antropogénica. Por citar un ejemplo, una fuente emisora de contaminantes como lo es una industria petroquímica (exploración, refinación y comercialización), la casuística se rompe al no dilucidarse los factores causales de una epidemia que recomiende una acción preventiva. Pese a señales, que nos envían indirectamente investigadores de las ciencias animales como Hernández (1997) y Martínez *et al.*, (2013), quienes han proporcionado información tendiente a relacionar para esta región en particular observaciones relacionadas con cambios ocurridos en sus sistemas de producción animal a consecuencia del papel que juegan los metales pesados como elementos xenobióticos en la salud de los bovinos cuando bioacumulan metales como Cadmio, Molibdeno y Zinc en órganos y tejidos como hígado, riñón, musculo, piel y sangre,

que están por encima de los límites permisibles en la normativa internacional (Alcocer *et al.*, 2007; Madero y Marrugo, 2011).

En la actualidad, los metales pesados tienen un gran significado como indicadores de la calidad ecológica de suelos debido a su toxicidad y muy especialmente al comportamiento bioacumulativo en agroecosistemas (Sánchez, 2007). La acción de los metales es de gran importancia debido a esta propiedad de bioacumulación, toxicidad y efectos directos a la salud todo tipo de sistema viviente en las relaciones suelo-agua-planta y ser humano (Weng *et al.*, 2001).

En el trópico es muy reconocida, la tolerancia de forrajes como las especies de *Brachiaria*. Olivera (2009), interpreta que estas poaceas tienen la virtud de poseer una capacidad amplia de adaptación a los ambientes rústicos, lo que redundaría en ciertas características agronómicas, como son: la producción de hojas y pequeños rizomas que facilitan la emergencia de los tallos, su tasa de crecimiento y su alta capacidad para la producción de forraje en condiciones estresantes.

Roca *et al.*, (2009), calcularon en un manto arable con pastizales el contenido total de los metales pesados como Mn, Fe, Zn, Cu, Cr, Co, Ni, Cd y Pb, analizando mediante técnicas estadísticas multivariadas los diferentes orígenes que estos metales tenían en suelos de Galicia.

En Colombia, Arroyave y colaboradores (2010), estudiaron la transferencia de mercurio y Cadmio desde el sistema suelo hacia *Brachiaria dictyoneura* en función de la capacidad bioindicadora y bioacumuladora, estos investigadores apreciaron durante la evaluación al dopaje con Cadmio sobre la especie vegetal que se presentaba una disminución en el crecimiento del 65%.

Se presentó en este capítulo, dos propósitos:

- Estimar frecuencias de pastos de trópico bajo en la región, adaptadas a suelos metalíferos, complementada con índices de diversidad ecológica en corredores aledaños a explotaciones y refinerías petrolíferas. De esta manera se estableció si existía una relación entre la presencia de metales pesados como Cadmio y Plomo en la capa superficial del suelo y la respuesta de especies de pasturas en la dimensión ecológica.
- Con las frecuencias de géneros botánicos principalmente de *Brachiaria*, se determinaron análisis sobre los contenidos de Cadmio y Plomo en diferentes tejidos vegetales.

3.1.2 Materiales y métodos

Estimación de frecuencias de *Brachiaria* en campo y sus contenidos bioacumulados de Cadmio y Plomo, en tejidos vegetales de raíz, tallo y hojas.

- **Localización.** El estudio se realizó en tres fases: campo (investigación exploratoria) en los municipios de Yondó y Barrancabermeja en el Magdalena Medio Colombiano, las siguientes dos fases en el laboratorio (investigación diagnóstica), en la Universidad Nacional de Colombia en la Sede de Palmira.

En la fase de campo se recolecto material vegetal y de suelo, en los corredores petrolíferos del el Centro en Barrancabermeja en el Departamento de Santander, la cual se denominó (zona de refinería); en los pozos de exploración en Casabe el municipio de Yondó en el Departamento de Antioquia; distante unos seis kilómetros de la Refinería de Barrancabermeja y como testigo libre de contaminación se recolecto material en predios de la Universidad de la Paz (a 17 kilómetros del Casco urbano de la Ciudad de Barrancabermeja) la cual no presenta actividades propias a una industria petrolera. Las tres zonas presentaban una alta actividad ganadera, con pasturas de trópico bajo, dominadas por pasturas mejoradas por el CIAT, de gramíneas especialmente especies de Brachiarias y leguminosas para suelos con baja fertilidad (Canchila *et al.*, 2011). Su

formación vegetal característica fue la de bosque húmedo tropical, con praderas de topografía ondulada y plana, con una precipitación promedio anual de 2800 mm, temperatura media de 29°C y humedad relativa de 80%.

Las condiciones fisicoquímicas de estos suelos donde se desarrolló la investigación se recogen en el anexo K. Resumiendo estos análisis mostraron las siguientes características representativas dominados por texturas francas y franco arenosas, con contenidos de materia orgánica (MO) muy bajas sobre todo en los sitios cercanos a las refinerías y campos petrolíferos (donde los valores porcentuales oscilaron entre 2,0% y 3,8%). Los valores de pH en todos los casos indicaron que estos suelos son extremadamente ácidos (4,4 y 4,8); los elementos mayores y menores presentaron los siguientes rangos: [fósforo (P) 8 y 21 cmol (+). kg⁻¹]; [calcio (Ca): 0,35 y 0,89 cmol (+). Kg⁻¹]; [magnesio (Mg): 0,21 y 0,42 cmol(+). kg⁻¹, potasio (K): 0,43 y 0,62 cmol(+). kg⁻¹, [aluminio (Al): 11,3 y 25,3 cmol(+). kg⁻¹; [(C.I.C) 10 y 21 cmol(+). kg⁻¹; Nitrógeno (N) 0,32 y 0,72 cmol(+). kg⁻¹]; Hierro (Fe) 96 y 198 mg/kg, Manganeso (Mn) 11 y 22 mg/kg, Zinc (Zn) 54,1 y 88,1 mg/kg, Cobre (Cu) 63,4 y 133,4 mg/kg. Se destaca los bajos contenidos de Fósforo, Calcio, Magnesio, Potasio y Nitrógeno, denotando una baja fertilidad (Bolívar, 1999; Canchila *et al.*, 2010).

- **Toma de muestras y procedimiento experimental.** Para la recolección de las muestras vegetales y de suelo, se tomó muestreos durante la estación seca del mes de junio del año 2012. Se estableció para cada corredor petrolífero y para el testigo se delimitó un transecto en relación a la distancia desde el foco central de las operaciones de la refinería de ECOPETROL en el campo del Centro en Barrancabermeja, en los campos de Casabe sobre los pozos de exploración y sobre los predios de la Universidad de la Paz (Unipaz), respectivamente, a distancias (transectos) de 50 metros, 500 metros, 2500 metros y 5000 metros. En cada sitio donde fue fijado el muestreo se tomó suelo a dos profundidades de 5 y 30 centímetros respectivamente, cada sitio georeferenciado debidamente.

En el diagnóstico (exploratorio) para determinar presencia y niveles de metales pesados, análisis de suelo y de tejido vegetal de las pastura tropicales encontradas, se recolectaron por triplicado, siguiendo las recomendaciones de Ruiz (2011), para cada punto del transecto, se analizó los diferentes tipos y usos del suelo en la finca y los límites que estos

suelos tienen dentro del paisaje para definir las unidades y subunidades de muestreo (pendiente, material parental, uso, manejo) (Cuesta *et al.*, 2005). Se buscó siempre que las muestras fueran preferiblemente homogéneas en cada agroecosistema y que estuviera determinado por paisaje de pastura tropical, siguiendo los criterios de Halffter *et al.*, (2005). Las muestras de suelo, fueron tomadas siguiendo las recomendaciones de Brady y Weil, (2008), buscando que las muestras de suelo fueran a su vez un componente de varias submuestras tomadas aleatoriamente en el campo. El tamaño de la muestra ideal en el transecto se estableció con un nivel de seguridad del = 95%, con precisión igual al 3%, con un $p \leq 0,05$ (5.0%) que maximiza el tamaño de la muestra donde:

$Z_{\alpha/2} = 1.962$ (ya que la seguridad es del 95%)

p = proporción esperada (en este caso 5% = 0.05)

$q = 1 - p$ (en este caso $1 - 0.05 = 0.95$)

d = precisión (en este caso un 3%).

La intervención antrópica fue estimada con la presencia de los metales contaminantes que se encontraron en los corredores propios los doce sitios inventariados, en sus niveles vegetación y uso de suelo agrícola.

Los metales pesados tóxicos Cadmio y Plomo, en las muestras de suelos se determinaron con base en tomar para el análisis de química analítica, aproximadamente un kilogramo de tierra extraída con un extractor o “corer” metálico a una profundidad entre 5 y 30 centímetros. La muestra, se extrajo de varias partes del suelo donde se había evidenciado la presencia de bovinos pastoreando. El material edáfico, se empaco en bolsas plásticas secas, se sellaron y se procesaron en el laboratorio de fisiología vegetal, donde se procesaron las muestras con la ayuda de un espectrofotómetro de absorción atómica marca (Varian Spectra AA- 20FS) utilizado para la determinación de los metales, este aparato está equipado con una lámpara de cátodo hueco, apropiada para cada elemento, y una lámpara de deuterio para la corrección de fondo. Las condiciones analíticas para la cuantificación de los metales “pseudo-totales” mediante EAA-llama. La longitud de onda utilizada en todos los casos fue referente para cada elemento, de manera que se obtuvo una mayor sensibilidad, reportando valores expresados en miligramo/kilogramo (ppm) para cada metal. Con el material vegetal recolectado, para el examen del contenido de los

metales en las plantas existentes en la zona de estudio, las muestras fueron tomadas siguiendo la metodología propuesta por Sánchez (2010), en recolectar material vegetal, empleando bolsas plásticas con sellado hermético, las cuales se enviaron refrigeradas con el fin de evitar la fuga de algún material volátil. Los materiales vegetales que se recolectaron en cada transecto, fueron identificados con base a los ejemplares depositados en los herbarios de referencia de la Universidad Nacional de Colombia y de la Universidad de Pamplona.

Con el fin de medir el impacto ecológico que generan estos suelos contaminados con metales pesados tóxicos como el Plomo y el Cadmio, se determinó los índices de frecuencia, diversidad y riqueza, mediante las siguientes expresiones matemáticas.

Frecuencia absoluta (f_i):

$$\sum_{i=1}^{i=s} f_i = N$$

Frecuencia relativa (n_i):

$$n_i = \frac{f_i}{N}$$

Frecuencia acumulada F_i , Frecuencia relativa acumulada, Índices ecológicos de diversidad:

ALFA: riqueza específica de una comunidad local

Shannon-Weiner:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

Simpson:

$$D = \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

- **Determinación de contenidos de Cadmio y Plomo en tejidos vegetales en raíz, tallo y hojas en poblaciones de *Brachiaria* en campo.** Una vez se había concluido el estudio

exploratorio de campo, se procedió a analizar específicamente los materiales recolectados del género *Brachiaria* spp. En los corredores y transectos, lo mismo que el suelo aledaño a sus raíces. Siguiendo las metodologías de muestreo y procedimientos de determinación de contenidos de metales pesados (Sánchez, 2010. Ruiz, 2011).

- **Análisis estadístico.** Los datos sobre presencia de metales pesados y su interacción con los agroecosistemas de pastura fueron analizados con metodología multivariable de análisis de componentes principales (PCA), al igual que para las poblaciones específicas de *Brachiaria*, mediante el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.I. Se discriminó en ambos apartes del muestreo general (frecuencia de pasturas) y en el específico de inventario de géneros de frecuencia de géneros de *Brachiaria*, cuales variables ambientales y biológicas explican con mayor peso cada componente principal sintetizando así la máxima variabilidad residual contenida en los datos. Las frecuencias determinadas en ambos estudios se realizaron con base en cálculos de la frecuencia relativa, absoluta y acumulada descritas anteriormente.

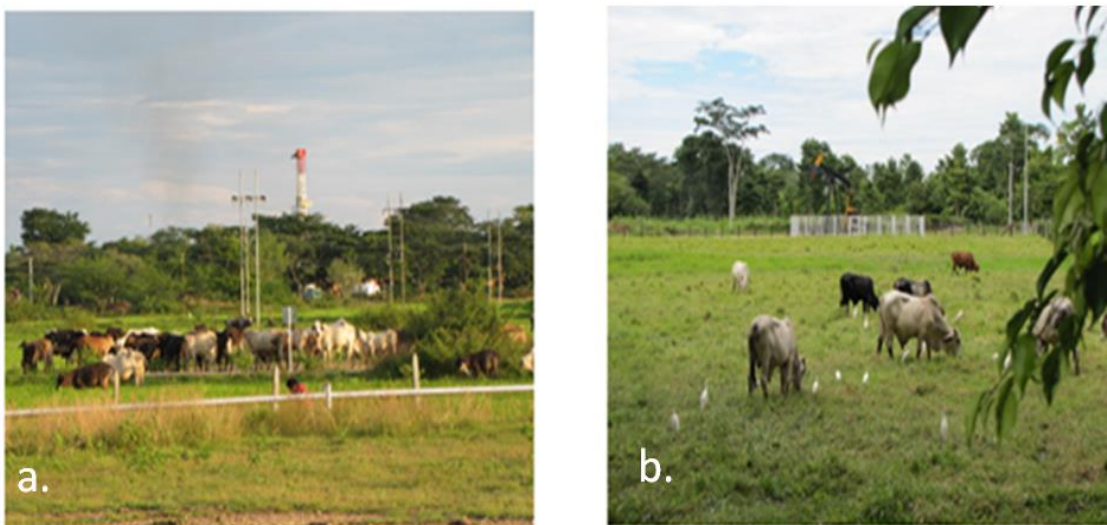
Para los géneros de *Brachiaria*, la información contenida en los datos sobre persistencia de los metales pesados Cadmio y Plomo en suelos y sus contenidos a nivel de bioacumulación en campo en los tejidos vegetales raíz, tallo y hojas, se analizaron con estadística de ANOVA Multifactorial para la bioacumulación del metal en la planta recolectada, en los factores: Zona (corredor), Transecto (distancia focal) y especies de *Brachiaria*, explorando las relaciones entre tres variables en una gráfica individual. Con el programa Minitab versión 16, se graficaron los valores para los factores X y Y (predictores) en los ejes X y Y, mientras que las líneas de contorno y las bandas de colores se representaron los valores del factor Z (respuesta), mediante la aplicación del método gráfico de ARIMA.

3.1.3 Resultados y discusión

Estimación de frecuencias de *Brachiaria* en campo y sus contenidos bioacumulados de Cadmio y Plomo, en tejidos vegetales de raíz, tallo y hojas.

El Inventario de pasturas tropicales adaptadas a suelos con presencia de metales pesados como Cadmio y Plomo, en zonas con actividad petrolera en la región del Magdalena Medio en Colombia, arrojó en estos resultados exploratorios que en dichos corredores ecológicos hay agroecosistemas de pasturas de trópico bajo dinámicos con una alta inversión en semovientes en las inmediaciones tanto de pozos como en la refinería, Figura 1a y 1b, caracterizados con suelos pobres en nutrientes, con bajos contenidos sobre todo de fósforo siendo este nutriente muy poco aprovechable por las pasturas establecidas en estos suelos extremadamente ácidos (Canchila *et al.*, 2010).

Se presentan las frecuencias del inventario de pasturas de trópico bajo por familias y géneros en el cuadro 5 y la Figura 2.



Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 1. Animales pastoreando en suelos con dos diferentes fuentes de contaminación (a) sitio cercano a refinería. (b) Sitio cercano a un pozo de exploración.

Las cuales se han adaptado en los corredores estudiados por la alta contaminación de actividades antropogénicas propias de una industria creciente como la del petróleo, la cual ha dejado a lo largo de casi 80 años asentamientos petrolíferos en la región del Magdalena Medio Colombiano en la región de Casabe (Yondó, Antioquia) caracterizados por pozos petrolíferos; el Centro (Barrancabermeja, Santander) reconocido distrito en donde se produce el fraccionamiento y las transformaciones químicas del petróleo, denominada comúnmente como refinería y por último la Universidad de la Paz (Unipaz), la cual es el

principal centro de estudios de la región, con programas de ciencias agropecuarias, esta última no cuenta con ninguna actividad petrolera, por lo que se dejó como corredor testigo.

Cuadro 5 Frecuencia para las principales familias botánicas encontradas en la zona

Familias	Valor	Frecuencia	Frecuencia Relativa	Frecuencia Acumulada	Frecuencia Rel. acum.
Fabaceae	1	47	0,2448	47	0,2448
Cyperaceae	2	13	0,0677	60	0,3125
Poaceae	3	85	0,4427	145	0,7552
Malvaceae	4	18	0,0938	163	0,849
Melastomataceae	5	1	0,0052	164	0,8542
Cucurbitaceae	6	3	0,0156	167	0,8698
Convolvulaceae	7	5	0,026	172	0,8958
Euphorbiaceae	8	8	0,0417	180	0,9375
Phyllanthaceae	9	2	0,0104	182	0,9479
Caesalpiaceae	10	2	0,0104	184	0,9583
Commelinaceae	11	5	0,026	189	0,9844
Amaranthaceae	12	1	0,0052	190	0,9896
Asteraceae	13	1	0,0052	191	0,9948
Typhaceae	14	1	0,0052	192	1

Fuente: Peláez, M. 2013.

Nótese como hay una alta abundancia de las especies propias de las familia poaceae con un 85 por ciento, seguido de las fabaceae con solo el 47 por ciento, lo que representa apenas la mitad, las demás familias botánicas representan un peso muy bajo en el contexto de las pasturas con frecuencias muy especiables en comparación con las gramineas de tropico bajo, que siguen siendo las plantas más utilizadas por los ganaderos sin importar tipología de productor. Mientras que las leguminosas, en criterio de autores como Juarez (2006), coincide con estos resultados cuantitativos de frecuencia relativa acumulada para estas dos familias en Mexico, esto es coherente por lo dicho por expertos en forrajes tropicales quienes consideran que las leguminosas tropicales han sido muy poco aprovechadas en la alimentación animal (Canchila *et al.*, 2011).

Sin embargo, son plantas que se encuentran de manera abundante en la mayor parte de los ecosistemas tropicales de América Latina, aunque por debajo de las gramineas

principalmente las especies de *Brachiaria*, lo que las convierte en plantas muy rústicas, adaptadas a diferentes tipos de estrés (baja fertilidad, suelos inundados y saturación en el porcentaje de Aluminio, Giron (2013), y los metales tóxicos como se aprecia en estos estudios preliminares presentados en esta investigación.

Este estudio corrobora el dominio de las especies de *Brachiaria* para los tres corredores, explicar las razones del éxito de estas pasturas tropicales, es su mejor adaptación a condiciones de estrés por sequía como *B. humidicola* (Borgues *et al.*, 2012), a suelos inundados como *B. radicans* (Jiménez *et al.*, 2010), suelos pobres y ácidos como *B. humidicola*, *B. decumbens* y *B. mulato* (Canchila *et al.*, 2011), con una alta resistencia a cargas animales, *B. humidicola* y *B. brizantha* (Lascano, 2002), esto se corrobora en las Figuras 1 a y 1b. Sumado a síntesis de los análisis de suelo referentes de fincas en la zona mencionados por tener textura, franco-arenosa, (ácidez) entre 4.2 y 4,9, baja fertilidad, con saturación de aluminio que van desde trazas hasta 83% donde otros pastos no crecen.

Además muy tolerantes a suelos húmedos y encharcados, alternados con sequías cortas, en esta región interandina donde las precipitaciones pueden oscilar entre zonas desde áreas secas hasta húmedas, de 0 hasta 800 msnm con precipitaciones de 1,000 a 4,000 mm anuales.

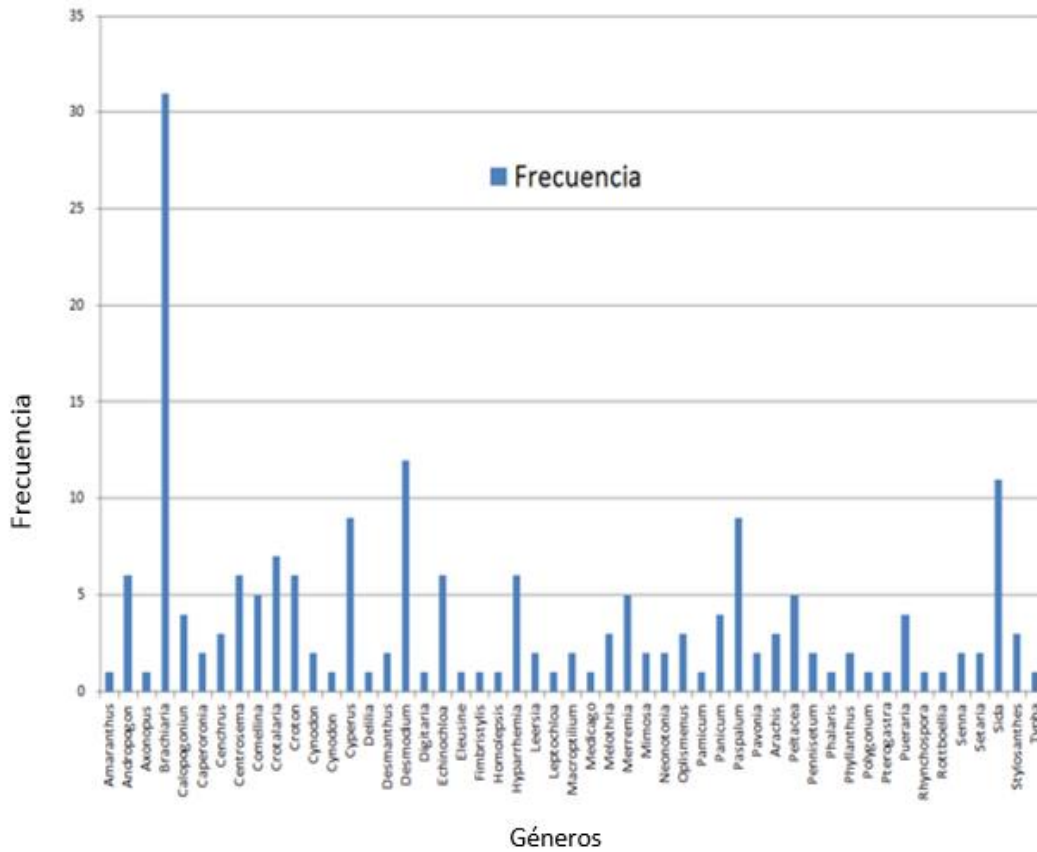


Figura 2. Grafico frecuencia de géneros encontrados en los tres corredores de estudio.

Fuente: Peláez, M. 2013.

En la tabla 3. Se aprecia los resultados de análisis de componentes principales, donde se obtuvo un número reducido de combinaciones lineales de las 9 variables que explicaron la mayor variabilidad (78,12%) en los 3 primeros componentes.

Tabla 3. Análisis de Componentes Principales

Componente		Porcentaje de	Porcentaje
Número	Eigenvalor	Varianza	Acumulado
1	4,26	47,24	47,23
2	1,59	17,70	64,94
3	1,19	13,19	78,12

Fuente: Peláez, M. 2013.

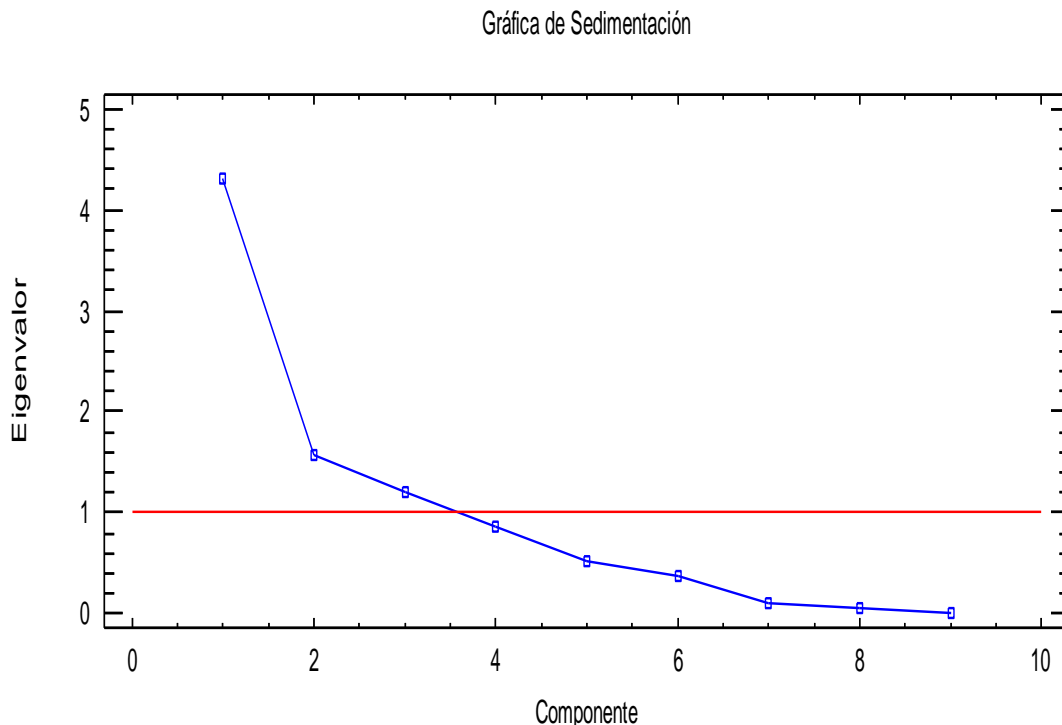


Figura 3. Número de ejes retenidos.

Fuente: Peláez, M. 2013.

En la Figura 3 se muestra la gráfica de sedimentación, donde solo tres ejes son seleccionados hasta que hay decrecimiento brusco en la magnitud de estos valores propios, por debajo de la línea roja límite de la variabilidad de los datos mayores que 1.

En la tabla 3 se aprecia el peso de los componentes principales retenidos para este caso tres. En el componente principal uno, se agrupan como las variables de mayor peso explicativo referentes como persistencia de Cadmio y Plomo en el perfil del suelo tanto para los sistemas radicales de leguminosas y poáceas, mostrando a su vez como las zonas, influyen en que se presente una mayor persistencia en la medida de que la zona presente mayor actividad antrópica.

En el componente dos para este caso se le llamaría botánico, reúne información de peso en relación a estas variables como la familia, el tipo de pastura, y las frecuencias en que

se recolectaron. En el componente 3, solo el transecto representa peso, entendido como la cercanía a las fuentes de contaminación.

El primer análisis con las 9 variables originales permitió eliminar aquellas que agregaban muy poco y sólo contribuían a distorsionar el análisis. De tal manera que solo se requirieron 3 componentes para que la proporción de la varianza total fuera explicada a partir de la matriz de correlación alcanzando un valor porcentual de 78,22%, bastante elevado para explicar la caracterización del sistema (cuadro 5).

Las observaciones de los componentes principales y la interpretación de estas nuevas variables transformadas, las cuales ya no tienen el mismo significado de las originales. Cada componente es el resultado de una combinación lineal de las variables en donde cada una tiene una ponderación diferente, en proporción a las magnitudes de cada elemento que conforma el autovector respectivo. Por consiguiente, el significado de cada componente dependerá de la magnitud de tales ponderaciones y de su signo a lo cual es necesario encontrarle sentido desde un punto de vista técnico (Rabosky, 2009).

El primer componente es el que tiene la varianza más alta y por lo tanto la mayor capacidad exploratoria de los datos. En este caso alcanza el 47,231 % del total según la Tabla 3). En este primer componente, se observan valores positivos en proporciones más o menos análogas de aquellas variables que en su conjunto representan la residualidad de los metales Cadmio y Plomo en el suelo. Estos resultados se pueden interpretar como el de un componente cuyas magnitudes están asociadas con la contaminación en un sentido vertical a lo largo del corredor ambiental y que tienen valores elevados de las variables mencionadas (Gómez *et al.*, 2011). Se aprecia cómo estas variables están vinculadas al concepto de contaminación y foco, podría señalarse que los valores altos de este componente se encuentran vinculados a los focos de emisiones, este aspecto explica la tercera parte de la variabilidad total. Podría destacarse entonces que los suelos más alejados a los focos de contaminación en la refinería y los pozos son los responsables de seleccionar a las poblaciones vegetales, lo que representa tolerancia a la situación de estrés abiótico, como se aprecia en las Figuras 1 y 2. Esto indica además que en estos transectos la ganadería no es viable, desde el punto de vista de Salud Pública animal, y su repercusión en los consumidores en la cadena de cárnicos (Martínez *et al.*, 2013).

Tabla 4. Peso de los componentes ambientales en las observaciones de campo

64 Evaluación del estrés abiótico en *Brachiaria spp.* Inducido por bioacumulación de cadmio y plomo, en una zona aledaña al corredor petrolífero de Barrancabermeja (Colombia)

VARIABLES	Componente estrés ambiental ¹	Componente botánico	Componente zonal
Cadmio a 30 cm de profundidad	0,42	0,05	-0,23
Cadmio a 5 cm de profundidad	0,44	0,08	-0,11
Familia	-0,05	-0,66	-0,17
Frecuencia de aparición	-0,08	0,46	-0,05
Plomo a 30 cm de profundidad Pb30	0,45	-0,08	0,08
Plomo a 5 cm de profundidad Pb5	0,45	-0,10	0,10
Tipo de pastura	0,06	0,50	0,34
Transecto	-0,07	-0,25	0,83
Zona (corredor)	-0,43	0,05	-0,22

Fuente: Peláez, M. 2013.

El segundo componente explica un 17,05 % de la variabilidad total. Está referido a la familia botánica (especialmente poáceas y fabáceas), el origen de la pastura, si es introducida (naturalizada o mejorada), o nativa, y por último el corredor ecológico en donde se encuentre estas pasturas. La familia botánica, parece referirse a la importancia o no de bioacumular sobre todo Plomo a 5 centímetros de profundidad lo que sugiere entonces posiblemente un alto valor de transferencia de este metal a la planta, en detrimento del calcio, al ser reemplazado por el Plomo en las formas $Pb(NO_3)_2$. (García, 2006). Esta dinámica conduce a explicar la coevolución de estos agroecosistemas introducidos en estos ambientes metalíferos. Esto favorece a la planta gramínea en su proceso de adaptación. Donde se evidencia que este componente dos relaciona al primer componente, indicando que en los corredores y los transectos (zonas y subzonas), hay una baja diversidad y una alta abundancia, ya que en estos potreros no se hace ningún

tipo de manejo por parte del agricultor y del ganadero, así mismo no hay prácticas de biorremediación efectivas, que ayuden a minimizar el impacto de los efluentes (Pereira *et al.*, 2012).

El tercer componente interpreta el 13,186 % de la variabilidad total. Está referido a la frecuencia y al corredor, por lo que se complementa la información de los índices ecológicos de Shannon y principalmente Simpson, con valores positivos en la refinería para el parámetro abundancia Simpson 0.19 (100 m), 0.16 (500 m), 0.18 (2500 m); 0.10(5000 m); para la universidad de la Paz 0.09 (100m), 0.086 (500m), 0.06(2500m), 0.08 (5000m); para el corredor de los pozos petrolíferos 0.14(100m), 0.09 (500m), 0.095 (2500m) y 0.044 (5000m).

La Figura 4, muestra una biográfica que aproxima la distribución de la muestra multivariante en un espacio de dimensión reducida, para este caso de dimensión dos, donde se superpone la misma representación de las variables sobre las que se mide la muestra (Cárdenas y Galindo, 2004). Las variables representadas son normalmente los vectores, y coinciden con las direcciones en las que mejor se muestra el cambio individual de cada variable, apreciándose la fuerza de los vectores, asociadas a grupos de variables como la de profundidad de suelos para todos los casos positivos. Las variables relacionadas con los aspectos botánicos como el tipo de pastura, familias y las frecuencias encontradas, por último, se aprecia los valores correlacionados en negativo como las zonas o corredores y la distancia al foco de contaminación.

Uno de los temas ambientales que mayor controversia ha generado en los últimos años en países subdesarrollados es la magnitud y el ritmo de las políticas energéticas y mineras en el que se desmontan los bosques, selvas y campos de cultivo y potreros, para transformarlos en tiempo breve en complejos industriales a campo abierto como la exploración y refinación de recursos no renovables como el petróleo que emiten tóxicos generadas por el hombre (Mico *et al.*, 2006). Así, se transforma por consiguiente el paisaje y la composición de ecosistemas naturales y de los propios agroecosistemas (Gómez *et al.*, 2011), por una actividad industrial y minera que arroja al ambiente metales tóxicos como Plomo, Vanadio, Mercurio, Cadmio, Arsénico y cromo, muy dañinos para la salud humana y para la mayoría de formas de vida, ya que estos metales pesados son peligrosos porque tienden a bioacumularse, es decir aumenta la concentración de un producto químico en un

organismo biológico en un cierto plazo, comparada a la concentración del producto químico en el ambiente (Ruiz y Hernández, 2012).

Las pasturas de trópico bajo introducidas como *Brachiaria*, han mostrado tolerancia por estos ambientes metalíferos, por consiguiente la frecuencia de este tipo de pastura puede considerarse una amenaza para la biodiversidad, que conlleva a la pérdida de numerosas arvenses nativas que prestan un servicio ambiental, lo cual es evidente en estas zonas, donde se desarrolló este estudio (Esquivel, 2007). Las tablas de frecuencia en los tres corredores y los índices ecológicos de diversidad presentados en el cuadro 5, precisan como dos componentes (número de especies o riqueza de especie y la abundancia o equilibrio de especie, son impactadas por los efluentes a menor distancia de los focos de contaminación (Baker y Walter, 1990).

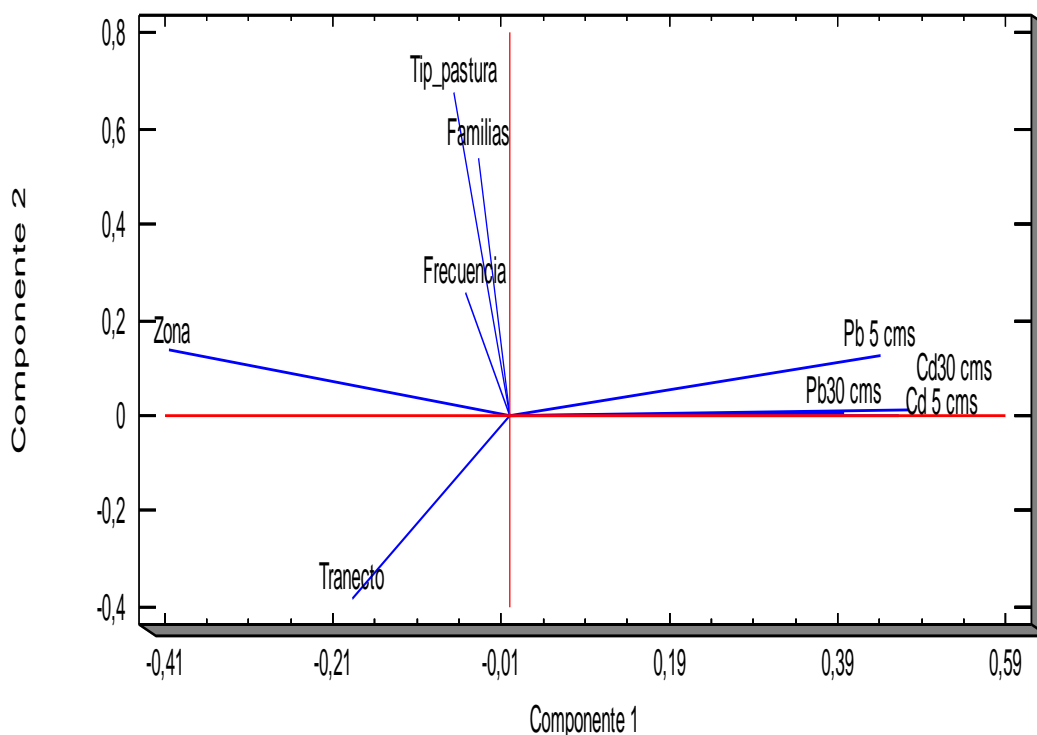


Figura 4. Bigráfica en dos dimensiones de componentes principales uno y dos, en estudio exploratorio de campo, mostrando variables con mayor peso explicativo

Fuente: Peláez, M. 2013.

Coincidiendo con autores como (Boularbah *et al.*, 2006 y Esquivel, 2007) quienes afirman que la diversidad es un tema muy importante en la ecología de las comunidades y en ecosistemas, permitiendo determinar si el ecosistema se mantiene normal o si está sufriendo algunas alteraciones.

En este estudio, es evidente la ocurrencia de dos acciones antrópicas el establecimiento de pasturas mejoradas sin manejo en sistemas intensivos de ganadería y una rápida expansión de la industria petrolera, ambas confluyen en mismo escenario. Por consiguiente, los datos reflejan bajos valores de índices como Shannon en los focos de la refinería, y los pozos que comparadas con el testigo son bajos, 0.19 (100m), 0.16 (500 m), 0.18 (2500 m) y 0.10 (500 m) respectivamente (Boularbah, 2006). (Cuadro 6).

Ahora, la biodiversidad indica cuantas distintas especies vegetales se encuentran en un corredor específico (Gaston y Spicer, 2004). No obstante, en las últimas décadas se ha ido perdiendo la biodiversidad por consecuencia de las actividades humanas, ya sea de manera directa (sobreexplotación) o indirecta (alteración del hábitat) (Takacs, 1996), que es lo que se aprecia en esta tesis, el cual debe llamar la atención a un problema ambiental, fitosanitario y zoonosológico, con repercusión al sistema de Salud Pública. Esto conlleva a estar atentos a interpretar estos índices con responsabilidad y que se dirija acciones valorativas y de monitoreo, temas en los cuales debe recaer acciones epidemiológicas en la perspectiva agrícola, ambiental, ocupacional y clínica (Mac Farlane y Burchettb, 2002, Madero y Marrugo, 2011; Martínez *et al.*, 2013).

Algunos autores como McPeck, (2007), afirman que hay una relación directa entre diversidad y número de especies, respondiendo a un modelo logarítmico, en los cuales los indicadores de diversidad podrían modificarse en escalas cortas de tiempo con pocas especies. La presente investigación, mostro la pobreza de comunidades florísticas como resultado de una fuerte fluctuación en el número de especies, si se mira la zona testigo que presento los mayores números de individuos. Los agroecosistemas de pastura estable como el corredor (control de esta investigación, predios de la Universidad de la Paz), llega a ser imperceptible a la contaminación como las rutinas agrarias en ausencia de infraestructura petrolera, aunque si presentó tráfico vehicular nutrido (en algunos casos hacia las zonas petroleras), por lo que en realidad esta es una zona de transición. Esto quiere decir que los índices no detectan efectos de contaminantes en bajas

68 Evaluación del estrés abiótico en *Brachiaria spp.* Inducido por bioacumulación de cadmio y plomo, en una zona aledaña al corredor petrolífero de Barrancabermeja (Colombia)

concentraciones, mientras los valores medios pueden pasar desapercibidos respecto a las variaciones aleatorias de la comunidad y del muestreo (Villanueva *et al.*, 2008).

Cuadro. 6. Resumen de datos de diversidad y riqueza de especies

Corredores												
Transectos	Refinería en el centro (B/bermeja, Santander)				Pozos en Casabe (Yondó, Antioquia)				Testigo (UNIPAZ, B/bermeja, Santander)			
	100 mt	500 mt	2500 mt	5000 mt	100 mt	500 mt	2500 mt	5000 mt	100 mt	500 mt	2500 mt	5000 mt
Distancias al foco												
Índices												
Nº Individuos	1355	1159	985	1623	1407	3218	1994	4665	2475	2039	4758	2928
Riqueza spp	11	9	10	19	9	15	14	28	19	14	25	19
Simpson	0,19	0,16	0,18	0,1	0,14	0,09	0,095	0,044	0,09	0,086	0,06	0,08
Shannon	1,98	1,97	1,95	2,56	2,05	2,52	2,46	3,19	2,65	2,53	2,98	2,7

Fuente: Peláez, M. 2013.

Esto coincide a lo hallado por Carrillo en el (2005) y Carrillo y otros en el (2006), quienes detectaron niveles relativamente bajos de metales pesados en las zonas de transición en agroecosistemas cercanos a explotaciones mineras en México. Solo cuando las variables ambientales son grandes los índices si están en capacidad de reconocer las alteraciones sobre la comunidad como se observó en el en el corregimiento del Centro (llamado aquí refinería). Para el caso de Yondó (pozos), y sus valores medios no permitieron reconocer la fase inicial del deterioro del ecosistema natural y de la contribución del agroecosistema pastoril por sí mismo (Nedelkoska y Doran 2003; Wei *et al.*, 2007).

El empleo de los componentes principales para tratar el efecto de los metales pesados sobre la estructura vegetal, se aprecia en los diversos entornos estudiados para cada corredor y transecto, discriminando desde la ecología propia las cuatro familias más adaptadas a este tipo de estrés abiótico (coevolución forzada) a los ambientes metalíferos

en los grupos de Poaceae (con mayor composición de *Brachiarias*) (McPeck *et al.*, 2008), las Fabáceas (con los géneros *Desmedían* y *Stylosanthes*), y las arvenses *Sida sp.* y *Cyperaceae*.

Donde estos géneros por ellos mismos han sido exitosos ante las situaciones de presión ambiental que les ha rodeado (Boularbah, *et al.*, 2006). Hay en el análisis de estas variables relaciones cualitativas y cuantitativas, de causa-efecto que se dan entre las poblaciones vegetales y su entorno. Esto no es un proceso a corto tiempo, se requiere condicionar sus estructuras anatómicas y morfológicas a la situación de estrés (Lasat, 2000).

3.1.4 Determinación de los contenidos de Cadmio y Plomo en tejidos vegetales en raíz, tallo y hojas en poblaciones de *Brachiaría* en campo

Esta información se presenta los gráficos de frecuencias para las especies de *Brachiaría* recolectados en campo, donde se destacan las especies de *B. decumbens* y *B. humidicola* como las más frecuentes en la región del Magdalena Medio Colombiano con 29 (%) y 26 (%) respectivamente, coincidiendo estos resultados con lo expuesto por: (Estrada, 2002; Pizarro, 2005; Olivera *et al.*, (2006); Canchila *et al.*, (2010) y Martínez *et al.*, (2013). Estos autores, reconocen en estas pasturas mejores condiciones de adaptación a estos ambientes tropicales húmedos, gracias a que han desarrollado ajustes en su fisiología y morfología que las hacen más eficientes en el uso de los recursos luz, temperatura y agua (Azcón-Bieto y Talón, 2000). Autores como Olivera *et al.*, (2007), reconocen que en estas pasturas de *Brachiarias*, con fotosíntesis tipo C4, a plantas que incorporan el CO₂ en otros compuestos, como una adaptación para soportar mejor la luz solar intensa y la sequía. En general todas las *brachiarias* encontradas en el inventario presentaron frecuencias relativas similares con dominancia de las especies *B. decumbens* y *B. humidicola* como se mencionó con 9 y 8 representantes en los tres corredores cuyas frecuencias son (0,29) y (0,25); las especies de *B. mulato* y *B. arrecta* ocupan un puesto intermedio con 4 representantes cada una (0,12); y las frecuencias más bajas son para *B. mutica* y *B. dictyoneura* con 1 especie cada una (0,03). (Figura 5.)

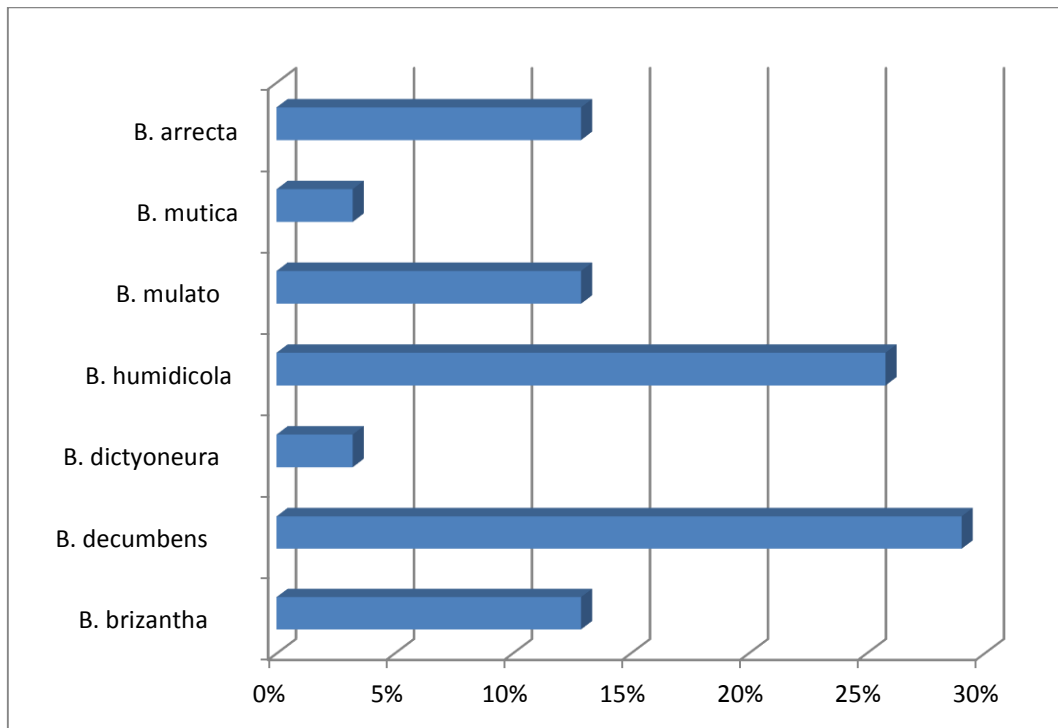


Figura 5. Especies de *Brachiaria* encontrados en los tres corredores de estudio.

Fuente: Peláez, M. 2013.

En la Figura 6. Se muestran los resultados de frecuencia para las siete especies del género *Brachiaria* en zonas y transectos, aparece en un primer nivel discriminado por corredores ecológicos que esencia son mismas zonas de estudio la refinería, los pozos y el testigo la Universidad de la Paz; en un segundo nivel los transectos o distancias al foco de contaminación (100 mt, 500 mt, 2500mt y 5000mt), y en un tercer nivel apilado en colores las siete especies de pasturas, mostrando como se agrupaban estas especies de acuerdo a grado de contaminación. Siendo muy representativo que en la zona de refinería se agrupaban en todos sus transectos solo dos especies, dominadas por *B. decumbens*, alternando para esta zona con *B. humidicola* y *B. brizantha*. En la zona de los pozos y en el testigo se presenta mayor frecuencia de otras especies de este género.

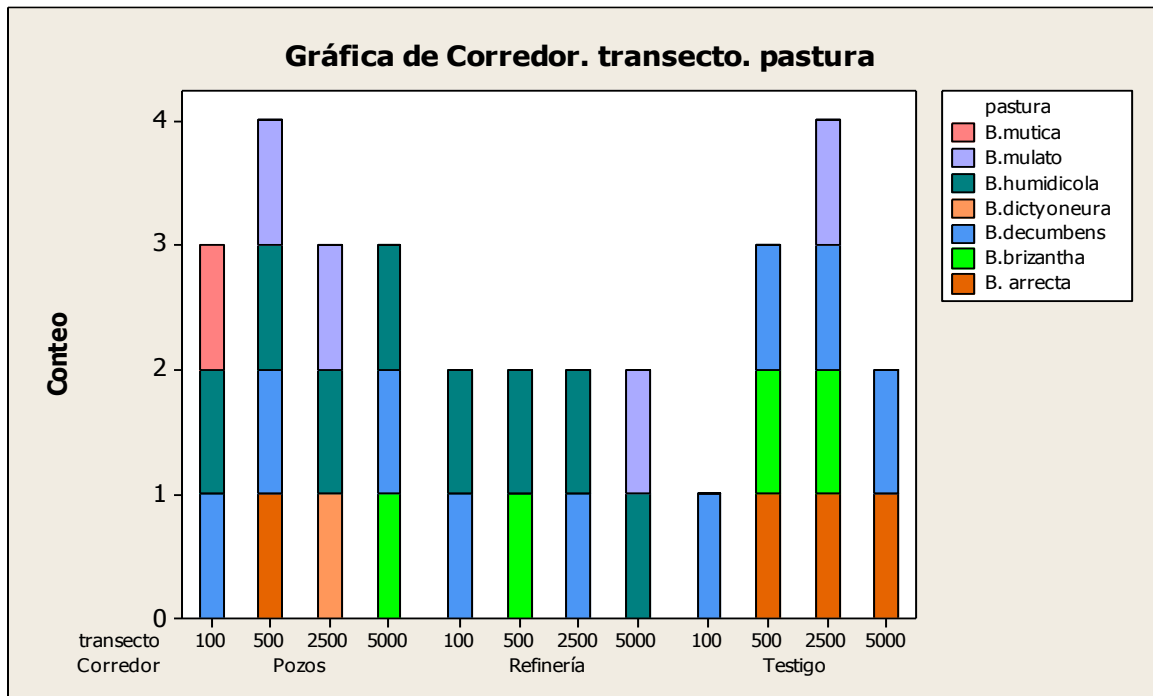


Figura 6. Frecuencias de especies de *Brachiaría* por zona y por transecto.

Fuente: Peláez, M. 2013.

En el cuadro 7, aparece un panorama global de la información exploratoria, donde aparecen los valores encontrados para disponibilidad de metales pesados en los suelos en las variable distancia horizontal desde los focos por transectos en metros (100, 500, 2500 y 5000) y la variable vertical definida como profundidad de suelo a 5 y 30 cm respectivamente, para cada uno de los doce sitios muestreados. Aparece los datos totales de metales pesados y se deja como referencia comparativa los niveles que se reportan como permisibles y tóxicos para estos metales tanto en suelo como en vegetales, tomado el pasto como otro cultivo (Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, 1999).

Los análisis de componentes principales (PCA) buscaron comprender cuál es el subespacio de mejor ajuste de combinaciones lineales de las 13 variables que mejor explicaron la mayor variabilidad en los datos. Extrayendo solo 3 componentes que tuvieron valores propios mayores o iguales que 1,0, explicando en conjunto (80,78%) de la variabilidad en los datos originales en Tabla 5. Los valores en esta tabla muestran para el primer componente 60,36, el segundo 11,89 y el tercero con 8,54, respectivamente).

72 Evaluación del estrés abiótico en *Brachiaria spp.* Inducido por bioacumulación de cadmio y plomo, en una zona aledaña al corredor petrolífero de Barrancabermeja (Colombia)

Cuadro 7. Valores consolidados de acumulación en suelos y bioacumulación en componentes vegetales, por zonas y por transectos (fase de campo).

Transectos biológicos (distancias hacia los focos de contaminación)										
Corredor			Cadmio (mg/kg)				Plomo (mg/kg)			
			100	500	2500	5000	100	500	2500	5000
Zona de Refinería. El Centro (B/bermeja, Santander)	En vegetales	Hojas	0,88 (0,55-1,2)	0,61 (0,22-1,13)	0,75 (0,21-1,22)	0,42 (0,16-4,44)	3,34 (1,16-4,44)	2,98 (1,06-4,34)	2,29 (0,48-4,36)	2,04 (0,27-4,42)
		Tallo	1,06 (0,23-1,34)	0,52 (0,25-1,02)	0,47 (0,24-0,66)	0,42 (0,12-1,21)	5,36 (1,65-7,36)	4,73 (2,01-7,79)	3,5 (0,75-6,78)	3,16 (0,67-5,91)
		Raíces	1,4 (0,9-1,72)	0,92 (0,6-1,32)	1,04 (0,75-1,53)	0,54 (0,29-1,21)	7,36 (1,88-11,43)	7,51 (2,98-11,42)	4,45 (1,15-8,02)	4,56 (0,99-10,08)
		Total en la planta	3,35 (1,62-6,18)	2,06 (0,6-3,11)	2,27 (0,56-1,92)	1,39 (0,25-1,86)	16,07 (5,38-20,49)	15,23 (0,99-11,76)	10,25 (1,23-12,3)	9,78 (0,91-19,99)
	En suelos	5 cm prof suelo	20,07	19,66	12,34	7,1	794,04	419,31	280,42	178,45
		30 cm prof suelo	2,2	1,7	1,1	0,87	67,53	58,45	41,58	40,54
Zona Pozos Casabe (Yondó, Antioquia)	En Vegetales	Hojas	1,36 (0,36-2,08)	0,62 (0,27-0,92)	0,44 (0,14-0,83)	0,58 (0,19-0,97)	1,88 (1,19-3,84)	1,37 (0,36-2,82)	1,58 (0,17-4,2)	1,91 (0,15-4,37)
		Tallo	1,93 (1,03-3,37)	0,77 (0,27-1,23)	0,54 (0,19-0,90)	0,58 (0,15-1,22)	4,23 (5,77-11,45)	3,66 (0,58-8,24)	3,1 (0,5-5,47)	3,81 (0,34-9,87)
		Raíces	2,83 (1,62-6,18)	1,69 (0,6-3,11)	1,01 (0,56-1,92)	0,95 (0,25-1,86)	6,82 (5,38-20,49)	5,92 (0,99-11,76)	4,97 (1,23-12,3)	6,29 (0,91-19,99)
		Total en la planta	6,13 (1,62-6,18)	3,09 (0,6-3,11)	1,95 (0,56-1,92)	2,09 (0,25-1,86)	13,16 (5,38-20,49)	10,97 (0,99-11,76)	9,66 (1,23-12,3)	12,02 (0,91-19,99)
	En suelos	5 cm prof suelo	18,9	12,13	8,62	7,99	780,67	590,61	267,78	161,01
		30 cm prof suelo	2,29	1,23	1,03	1,01	24,98	23,55	14,98	12,67
Testigo, UNIPAZ (B/bermeja, Santander)	En vegetales	Hojas	0,01 (0,003-0,013)	0,014 (0,005-0,048)	0,024 (0,02-0,038)	0,02 (0,012-0,085)	1,01 (0,64-1,45)	1,12 (0,76-1,48)	1,32 (0,66-1,65)	1,02 (0,52-1,44)
		Tallo	0,015 (0,008-0,012)	0,022 (0,002-0,032)	0,028 (0,01-0,042)	0,032 (0,012-0,098)	1,34 (0,78-1,78)	1,84 (0,78-1,78)	1,64 (0,88-1,76)	1,42 (0,98-1,78)
		Raíces	0,02 (0,006-0,028)	0,028 (0,016-0,044)	0,03 (0,026-0,039)	0,034 (0,024-0,086)	1,72 (0,96-2,14)	1,92 (0,96-2,14)	1,82 (0,99-2,02)	1,9 (0,96-2,04)
		Total en la planta	0,045 (0,017-0,053)	0,064 (0,023-0,094)	0,082 (0,056-0,10)	0,086 (0,048-0,99)	4,07 (2,38-5,37)	4,88 (2,5-5,4)	4,78 (2,53-5,27)	4,34 (4,46-5,16)
	En suelos	5 cm prof suelo	1,11	0,93	0,78	0,21	21,99	23,43	20,78	19,99
		30 cm prof suelo	0,11	0,1	0,11	0,12	16,87	14,07	14,8	12,98
Valor de referencia a nivel internacional, para vegetales en mg/kg			0,1-2,4 (Bowen, 1979; Azcue, 1993); 0,05 - 0,2 (Kabata y Pendas, 2004). Tolerable para cultivos agrícolas 0,05-0,5 mg/kg (Kabata y Pendas, 2004); excesivo o tóxico 5 - 30 (Kabata y Pendas, 2004)				0,2 - 20 (Bowen, 1979; Azcue, 1993); Rango normal 5 - 10 (Kabata y Pendas, 2004). Tolerable en cultivos agrícolas 0,05 - 10 (Kabata y Pendas, 2004). Tóxico 30 - 300 (Kabata y Pendas, 2004)			
Valor de referencia a nivel internacional para suelos en mg/kg			<0,01-2: suelos agrícolas, rango para USA (Holmgren et al., 1993); 0,44 suelos cultivados, República Federal Alemana (Crossman y Wustermann, 1992); 0,22: suelos cultivados de Francia (Baize, 1997)				7,5-135: suelos agrícolas, rango para USA (Holmgren et al., 1993); 85 : suelos, valor de referencia en Holanda (NMHPPE, 1991); 100 - 400: suelos, nivel tóxico (Kabata Pendas y Pendas, 1984).			

Fuente: Peláez, M. 2013.

Tabla 5. Análisis de Componentes Principales

Componente Número	Valores propios	Porcentaje de Varianza	Porcentaje Acumulado
1	7,85	60,37	60,37
2	1,56	11,89	72,26
3	1,11	8,54	80,79

Fuente: Peláez, M. 2013

En la tabla 6. Se muestra las ecuaciones derivadas de las variables de los factores: zona, transecto, tipo de pastura y las variables en un solo gráfico. Apreciándose la fuerza de los vectores, y la ubicación en el gráfico de peso de los componentes.

Tabla 6. Pesos de los Componentes Principales (PCA)

Variables	Componente 1	Componente 2	Componente 3
Cadmio a 30 cm de profundidad de suelo (Cd 30)	0,31	-0,16	-0,16
Cadmio a 5 cm de profundidad de suelo (Cd 5)	0,31	-0,24	-0,14
Cadmio bioacumulado en hojas (Cd H)	0,28	0,24	0,08
Cadmio bioacumulado en raíces (Cd R)	0,27	0,32	-0,16
Cadmio bioacumulado en tallos (Cd T)	0,31	0,22	-0,02
Plomo a 30 cm de profundidad de suelo (Pb 30)	0,23	-0,46	0,08
Plomo a 5 cm de profundidad de suelo (Pb 5)	0,31	-0,02	-0,26
Plomo bioacumulado en hojas (Pb H)	0,28	-0,06	0,25
Plomo bioacumulado en raíces (Pb R)	0,31	0,17	0,06
Plomo bioacumulado en tallos (Pb T)	0,33	0,03	0,22
Especies de Brachiaria	0,05	0,53	0,45
Distancia focal (Transecto)	-0,14	-0,20	0,63
Zona (Corredor ecológico)	-0,27	0,33	-0,32

Fuente: Peláez, M. 2013

Las variables más alejadas de las líneas de referencia en 0 hacen la mayor contribución a los componentes. Donde se aprecia los grados de asociación entre las variables dependientes con sus fuentes de contaminación en cada zona, y su respectivo distanciamiento hacia los focos (Gómez *et al*, 2011).

Estos resultados de la bigráfica (Figura 8) muestran para el primer componente principal las variables que representan un mayor peso expresando el grado de contaminación de metales en la zona, lo mismo que el transecto, lo cual se ve representado por los altos valores en niveles de bioacumulación de Cadmio y Plomo en la integralidad de la plantas evaluadas en cada uno de los doce sitios o corredores, tanto en su componente horizontal (transecto) como vertical (profundidad).

A su vez, para el segundo componente las especies de *Brachiaria* tienden a explicar que hay asociaciones importantes entre la presencia de algunas especies que tienden a asociarse con un factor explicativo en la zona (Lasat, 2000), aparece entonces una ligera tendencia a corroborar los niveles de contaminación con los niveles de bioacumulación encontrados, pero con sentido contrario o negativo, es decir que aunque en todas las zonas hay contaminación, es posible que esta se concentre en las dos zonas más vulnerables que son la refinería en el corregimiento el Centro de Barrancabermeja y los pozos en el campo de Casabe en Yondó.

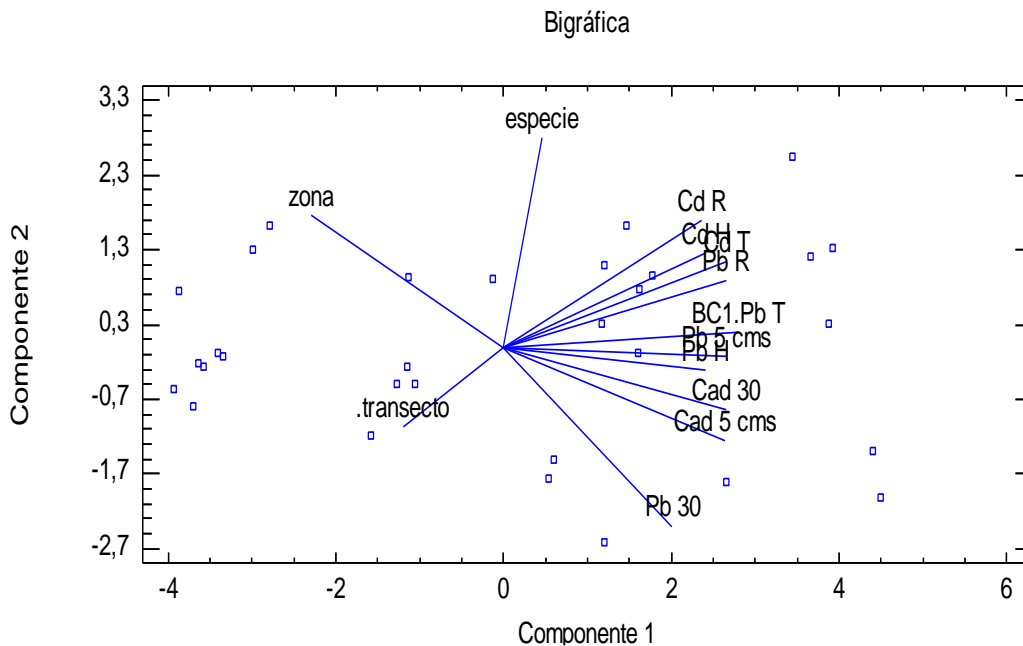


Figura 7. Bigráfica peso de los componentes principales, mostrando interacciones entre las variables en campo.

Fuente: Peláez, M. 2013.

Por consiguiente, estas pasturas toleran mejor el estrés metalífero que hay en las zonas aledañas a la industria petroquímica (contaminación antropogénica), y que esta bioacumulación se da principalmente en las raíces, coincidiendo con lo reportado por Ruiz y Hernández (2012), quienes encontraron mayor bioacumulación de Arsénico, Plomo y Zinc en las raíces de plantas de maíz cerca de depósitos mineros en la región de Jales, en México. En el tercer componente se aprecia como en la distancia focal cercana a las fuentes de contaminación, se presentó un menor número de especies de la familia Poaceae (frecuencia) que resisten este estrés abiótico.

3.1.5 ANOVAS multifactoriales por componentes vegetales (raíz, tallos y hojas)

Para las variables respuestas de bioacumulación de los metales pesados Cadmio y Plomo por componentes vegetales (hojas, raíces y tallos), se presentan los procedimientos estadísticos gráficos donde las fuentes de variación fueron: la especie, la distancia focal o transecto y la zona, para el total de casos explorados completos que fueron 31. Los procedimientos ejecutados mostraron para cada uno, ANOVA multifactorial gráficos, compilados en la (Figura 9. a, b, c, d, e, f). Se determinó qué factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre las variables respuesta.

La tabla ANOVA, descompuso la variabilidad para explicar la bioacumulación de Cadmio en hojas en contribuciones debidas a varios factores (especies, distancia focal y zona) para todos los ANOVAS se escogido la suma de cuadrados Tipo III, donde la contribución de cada factor se midió eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores, debido a que 3 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la bioacumulación de Cadmio en hojas con un 95,0% de nivel de confianza [Figura 9. (a)].

Los gradientes de bioacumulación en orden decreciente, son: refinería>pozos, a su vez estos dos mucho más distantes del testigo; en las distancias focales en metros presento el orden de 100>500>2500 y 5000 metros respectivamente siendo estos gradientes relativamente altos [Figura 9. (a,b,c,d,e,y f)]. Solo el factor zona resulto estadísticamente significativo sobre la bioacumulación en los tallos con un 95,0% de nivel de confianza, estos resultados se aprecian en la gráfica (b) de la (Figura 9).

En los pozos es donde hay una mayor bioacumulación de metal en los tallos, seguido de la refinería. En general, los tallos no mostraron diferencia significativa ni en las especies como tal, ni en cada transecto, siendo para estos dos factores bioacumulación de gradientes no diferenciales. Los 2 valores-P (Zona y Distancia focal), resultaron menores que 0,05, estos dos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la bioacumulación de Cadmio en la raíz, con un 95,0% de nivel de confianza (Figura 9.(c), en los pozos petrolíferos de Casabe en las pasturas de brachiarias, en el transecto de 500 metros. En resumen, el orden es como sigue en las zonas (pozos>refinería>testigo) y con respecto a la distancia focal aparece los transectos (500>100>2500>5000).

En Yondó, es donde se presentó los mayores bioindicadores de concentración de Plomo para todas las especies. Tanto en la distancia focal como en la zona presentaron un efecto estadísticamente significativo sobre la bioacumulación de Pb en las hojas, con un 95,0% de nivel de confianza. En los campos de la refinería, y en los transectos de 100 y 500 metros es donde se presentó los mayores gradientes de contaminación de Plomo en las hojas.

Entre las especies de *Brachiaria* no se presentó diferencias estadísticas significativas [Figura 9. (d)]. En el ANOVA donde se descompuso la variabilidad que explica la bioacumulación de Pb en los tallos, en contribuciones debidas a varios factores. Solo se presentó diferencia estadísticamente significativa para el factor zona [Figura 9. (e)].

El ANOVA para la bioacumulación de Pb en las raíces, solo el factor zona presentó diferencia estadísticamente significativa, en el orden decreciente es: pozos>refinería>testigo.

Las gráficas de los valores para los factores X y Y (zonas y transecto) en los ejes X y Y, se muestran las líneas de contorno y las bandas de colores que representan los valores del factor Z (bioacumulación de Cd y Pb). Estas gráficas ayudan a describir visualmente de manera similar a un mapa topográfico, como se grafican los valores X, Y y Z (Figura10). Donde se aprecian, los gradientes de bioacumulación. Los colores verdes oscuros

intensos, muestran hacia donde se dirigen los mayores valores de bioacumulación en relación a las zonas, en el caso del Cd en hojas, se aprecia que esta es más notoria en la zona de la refinería, y en los transectos más aledaños al centro de operaciones. A medida, que se aleja de esta fuente, disminuye la bioacumulación, cambiando la intensidad de los colores verdes pasando a más claros, y aparecen por consiguiente bandas o contornos con grises y azules como indicativo de que las plantas han dejado de bioacumular altos contenidos.

Para el caso del Cd en tallos la bioconcentración mayor involucra tanto la refinería como los pozos, y en el caso de la acumulación de Cd en las raíces (Lozano *et al*, 1997). Estos gradientes de bioacumulación, abarcaron una zona más amplia y tendieron a acumularse en transectos muchos más distantes, en relación a los otros dos componentes. Lo que nos puede indicar de que en estas especies, posiblemente la bioacumulación se mantenga en casos de existir fuentes de contaminación, y que preferiblemente se acumulan en las raíces. Para el caso de las hojas y los mismos tallos que presentan bioacumulación menor, presentados en los transectos a 2500 metros distantes al foco, se puede dar bioacumulación por encima de 0.2 ppm, lo cual podría generar problemas de biomagnificación en las cadenas trópicas (Becerril *et al.*, 2007).

Para el caso el caso de la bioacumulación de Pb en estos componentes vegetales se aprecia como este metal se bioacumula en las raíces preferentemente, y después en los tallos, a concentraciones muy altas, lo que coincide con las investigaciones realizadas por investigadores como Ruiz y Hernández (2012) en maíz, en donde concluyen que las altas exposiciones de las plantas de maíz a elementos como Cu y Pb, reducen significativamente su crecimiento y ocasionan una rápida inhibición en el desarrollo de las raíces.

En las hojas, esta bioacumulación es menor y solo es considerable para la zona de refinería a 100 metros. El efecto disminuye con la distancia. No obstante, para el caso del metal Cd no hay decremento notorio. A su vez, para el caso del Pb en las raíces, solo en los transectos por encima de los cuatro mil metros, comienza a disminuir el problema. Sin embargo, este metal aunque persiste en los tallos, no alcanza valores de bioacumulación importantes en las hojas, posiblemente esto denoté, la poca movilidad de este metal (Leung *et al.*, 2007).

En la graficas de las Figuras (9 y 10), se aprecia el fenómeno de la bioacumulación diferencial de Cadmio y Plomo componentes vegetales en hojas, tallos y raíces. Si bien la literatura en este aspecto no arroja cuales son los niveles máximos permisibles para pasturas de consumo en fresco para los diferentes tipos de ganadería, ni en el mundo, ni en Colombia. Solo se encuentra reglamentaciones para piensos o concentrados de consumo animal, lo cual no podría intentar homologarse a estas pasturas, que por lo esbozado aquí no es equiparable.

Como tampoco intentar homologar la reglamentación para vegetales comestibles de hoja ancha, o angosta, tubérculos o raíces (DOCE, 2001). Esto también, no es comparable con estos resultados. Solo se podría contrastar los niveles contenidos en suelos para uso agrícola, y aquí plantear el asunto de las pasturas una vez establecidas (este último aspecto solo tratado en este proyecto). Si bien algunos investigadores como Arroyave *et al.*, (2010), han cuestionado en medio de sus estudios el asunto de la contaminación antrópica, generado por la industria y las prácticas agrícolas, estas se trataron considerablemente en este investigación, con resultados relevantes. Se puede apreciar la tolerancia de las pasturas de *Brachiaria* a estos tres diferentes ambientes metalíferos, en relación a distancias de los focos de contaminación por zona, apreciando como las especies *B. humidicola* y *B. decumbens* se han adaptado a estos suelos con una alta persistencia a estos dos metales, como producto de las labores antrópicas propias con la industria petroquímica (refinación y exploración de petróleo por más de 80 años en estas zonas) (Adriano *et al.*, 2001).

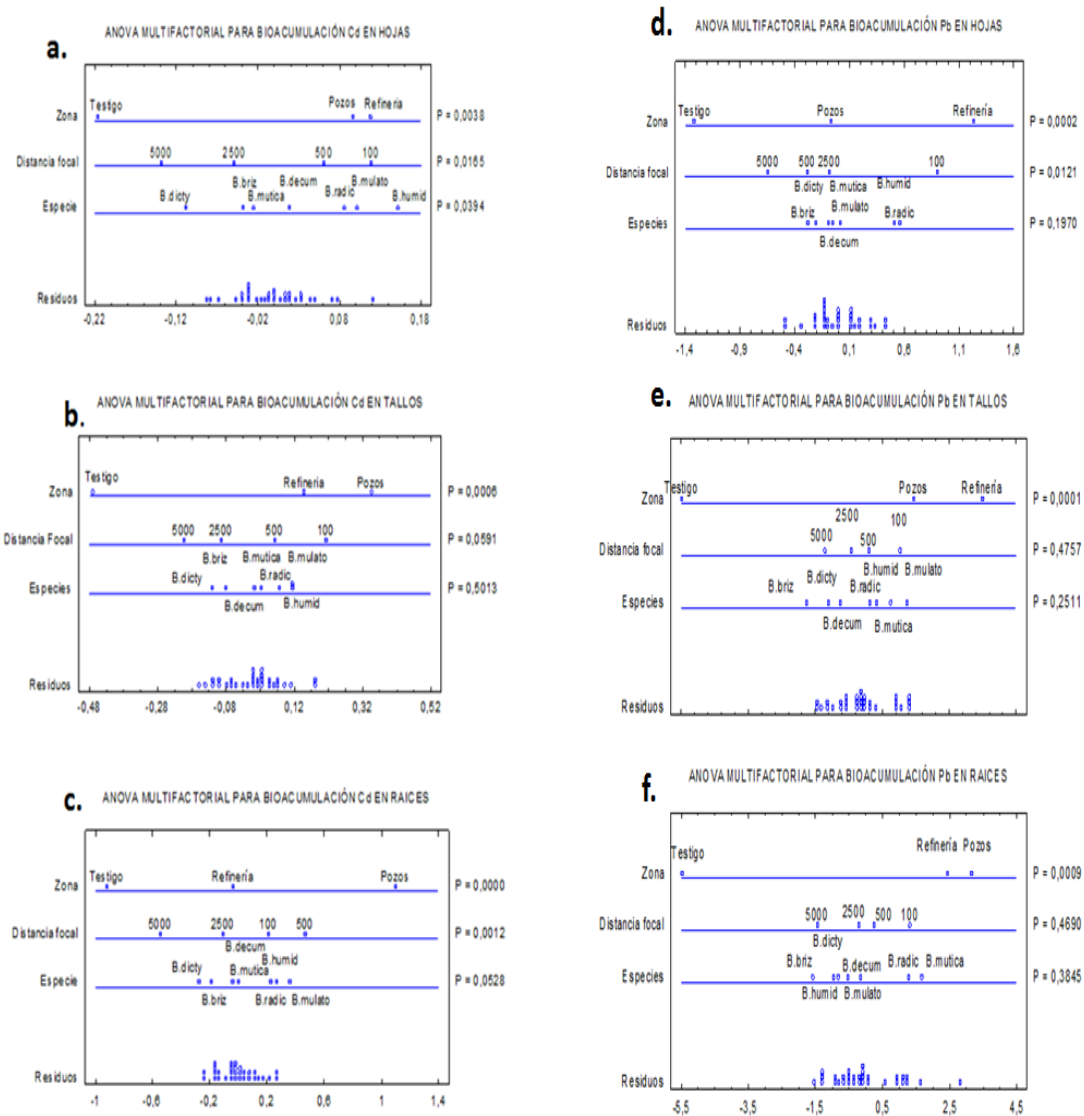
En estas zonas de refinería y de pozos de exploración en el Centro (Barrancabermeja) y Casabe en (Yondó), una vez que emiten estos metales tóxicos se bioacumulan en estas poáceas y pueden permanecer en el ambiente durante muchos años (Arroyave *et al.*, 2010). Además, su concentración en los seres vivos aumenta a medida que son ingeridos por otros, por lo que la ingesta de plantas o animales contaminados puede provocar síntomas de intoxicación, como lo reportado en los trabajos de Martínez y otros (2013), para esta región.

Ahora para una actividad como la industria petroquímica asentada en esta rica región del Magdalena Medio en Colombia. Si es posible, que se presente envenenamiento por un metal pesado como producto de la contaminación de espejos de agua, el suelo y de mismas pasturas establecidas (relación suelo-agua-planta-hombre-animal- ambiente) que están cerca de fuentes emisión, o a través de la cadena alimenticia, y su repercusión en la Salud Pública animal, vegetal y humana (Rizzi *et al.*, 2004; Pastor y Hernández, 2008a, Madero y Marrugo, 2011).

La actividad industrial petrolera en el Magdalena medio colombiano, aquí expuesta, arroja al medio ambiente metales tóxicos como Plomo, Cadmio, Zinc, Molibdeno, entre otros (Quintero, 2010). Ahora, este estudio fue direccionado hacia los metales Cadmio y Plomo básicamente, cuyos niveles de bioacumulación para el caso de Cd, fue significativo en las hojas de las pasturas establecidas en los suelos aledaños a la refinería.

Un xenobiótico como el metal Cadmio se incrementan como consecuencia de la actividad antrópica (industria y agricultura), que ha aumentado en las sociedades modernas, a finales del siglo XX y principios del siglo XXI, afectando de forma progresiva a los diferentes ecosistemas (Rodríguez *et al.*, 2008). El asunto es quizás más grave, por los resultados observados y discutidos en el Análisis de Componentes Principales (ACP) (Figura 8), es que a lo largo y ancho de los cinco transectos prácticamente aparecen estas pasturas bioacumulando Cadmio, sobre todo las especies *B. humidicola* y *B. decumbens* como dos especies con una tolerancia alta a estos ambientes metalíferos (Leung, 2007)

80 Evaluación del estrés abiótico en *Brachiaria spp.* Inducido por bioacumulación de cadmio y plomo, en una zona aledaña al corredor petrolífero de Barrancabermeja (Colombia)



Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 8. Gráficos de ANOVAS multifactoriales, para bioacumulación de los metales pesados Cadmio y Plomo (a) Cd en Hojas, (b) Cd en tallos, (c) Cd en raíces, (d) Pb en hojas, (e) Pb en tallos (f) Pb en raíces.

Ambas pasturas han sido mejoradas e introducidas por su rusticidad y tolerancia a otros tipos de estrés, tal adaptación de estas gramíneas forrajeras de trópico bajo se debe a que poseen atributos que están vinculados a las estrategias para adquirir nutrimentos en un entorno con bajo pH y alto contenido de Al (Rao *et al.*, 1998). Una tolerancia a estrés

metalífero, posiblemente sea el producto de procesos de adaptaciones bioecológicas, químicas y fisiológicas en los sitios contaminados (Baker y Walter 1990; Casierra, 2002, Leung, 2007). Las brachiarias mostraron diferencias en su desarrollo que responden a las distintas concentraciones de metales en el suelo (Rao *et al.*, 1993).

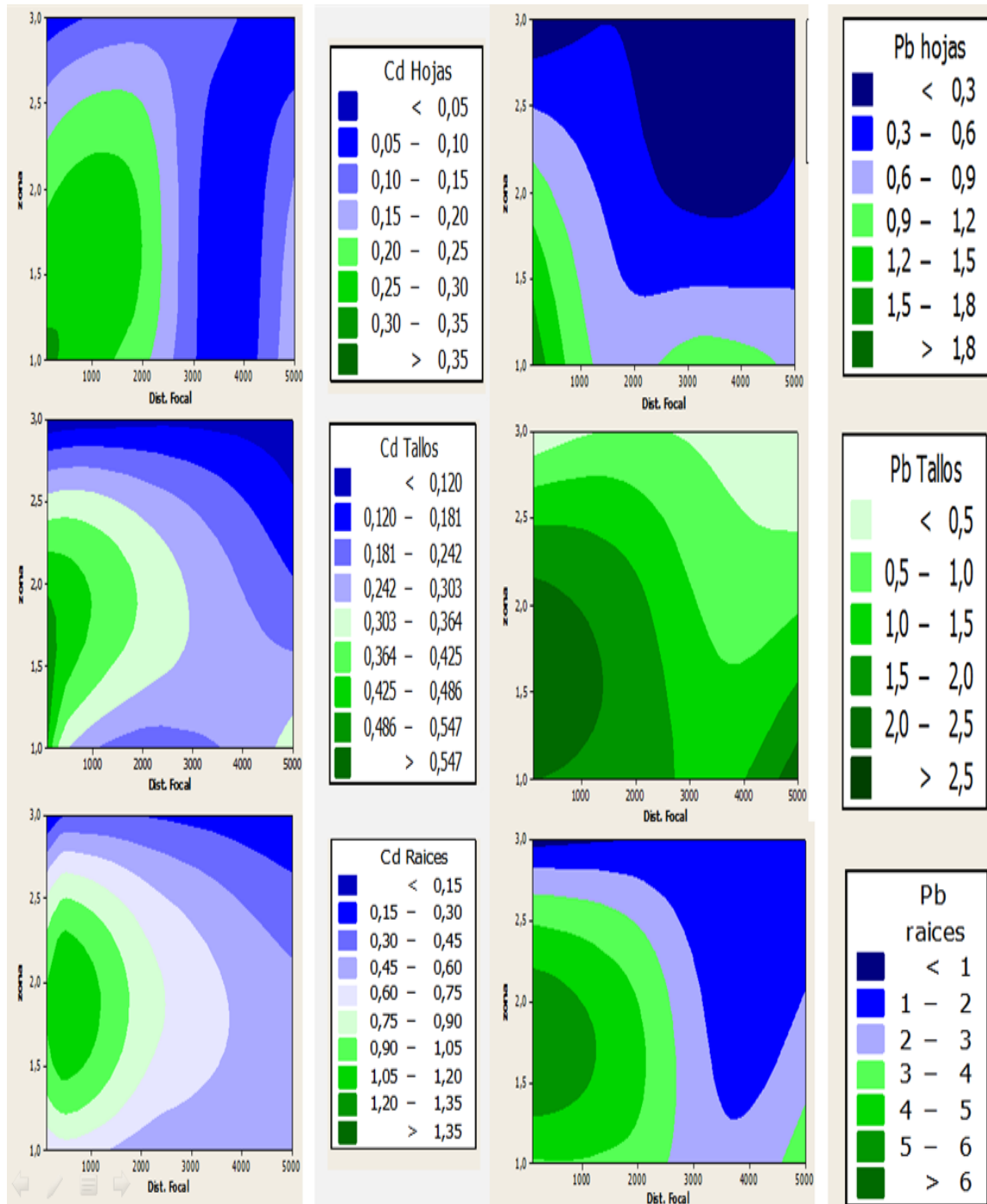


Figura 9. Gráficos de contorno (método de ARIMA) para gradientes de bioacumulación de Cd y Pb en hojas, tallos y raíces, en relación a zonas y distancias focales.

El CIAT, en Colombia dirige sus investigaciones a encontrar resistencia en estas pasturas a diferentes tipos de estrés abiótico, explorando genes candidatos que actúen en combinación a estrés por sequía, toxicidad de aluminio y de ambientes ácidos (Lascano, 2002 y Portela, 2011). Estas condiciones, son las que se presentan en estas zonas, a excepción de las sequías, ya que en general son históricas los registros de precipitaciones de 2800 mm por año, con temperatura media de 29°C y humedad relativa de 80%, condiciones agroclimáticas muy favorables para estos agroecosistemas de pastura tropical, además este estudio solo explora formaciones vegetales de bosque húmedo tropical.

Especies como *B. arrecta* (*B. radicans*) y *B. mulato*, parece ser promisorias al mostrar tolerancia a altos niveles de Cadmio en hojas y de Plomo en raíces. Sobre todo en un transecto que este próximo a un foco de contaminación, este hecho fue notorio con la bioacumulación con Cd en las hojas a 100 metros de distancia al centro de operaciones de la refinería (Figura 9). Sin embargo, estos niveles están altos, si tomamos como referencia los límites permisibles para alimentos animales que es de 0,2 ppm, se hace la salvedad que es para piensos, y que aquí, cabe una gama amplia de diferentes tipos de animales tanto monogástricos como los domésticos de cría, las aves y hasta las mismas mascotas (caninos y felinos), y para este caso los poligástricos como los bovinos que son herbívoros.

En la zona de Pozos en Yondó, también es la especie *B. humidicola* la más frecuente, bioacumulando en la mayor concentración Cd en las hojas a los 500 y 2500 m (Figura 8), respectivamente. La especie *B. arrecta*, se presenta como una planta bioacumuladora importante en los Pozos, para Plomo en raíces. Con respecto al testigo, la mayoría de estas especies bioacumula niveles medios, que están por debajo de los límites permisibles en la normatividad internacional, se reitera que es aplicable para piensos.

En el corredor testigo en general se presentaron los niveles mínimos de bioacumulación de Pb y Cd, aunque podría pensarse que la bioacumulación podría en primera instancia corresponder a un nivel basal (presencia de los metales en la corteza terrestre) o más por efecto del alto flujo vehicular alrededor del Campus Universitario sobre todo para la

contaminación con Plomo o las prácticas de fertilización de suelos, lo que ocasiona un nivel de depósitos directos como en caso del Cadmio con el uso de fertilizantes fosfatados que es la fuente principal de contaminación de este metal en suelos agrícolas, y de la utilización de lodos procedentes de aguas residuales que se utilizan en agricultura (Alloways, 1995, Rodríguez *et al.*, 2008, Maldonado *et al.*, 2011), esto en alguna medida conduce a que posiblemente el testigo actúe más como zona de transición que como blanco absoluto, pese a que en su asentamiento no hubo infraestructura petrolera, lo que coincide con los hallazgos de Carrillo en el (2005-2006), para vegetación bioindicadora de metales pesados en zonas de transición entre focos de efluentes mineros y zonas alejadas de los mismos, donde relaciono para muestreos de pasturas presencia baja de metales en las zonas de transición. No obstante, la selección de esta zona como testigo absoluto, se hizo con base en las características homogéneas de paisaje, condición edafoclimática y de fertilidad de suelos.

Evidentemente es necesario estudiar en un futuro, si estas poáceas podrían entrar en el campo de la fitoremediación, explorando sus propiedades fitoexclutoras o fitoestabilizadoras. Como plantean, Raskin *et al.*, (2000) y Prieto *et al.*, (2005) que algunas plantas hiperacumuladoras son, en muchos casos, endémicas de suelos ricos en metales pesados.

3.1.6 Conclusiones

En el Magdalena Medio Colombiano confluyen actividades industriales y agropecuarias, que arrojan al ambiente metales tóxicos como Plomo y Cadmio, que contaminan los suelos y agroecosistemas de pastura tropical con dominancia de las especies *Brachiaria especialmente humidicola* y *decumbens*, las cuales se muestran como tolerantes a estos ambientes metalíferos, presentando altos contenidos de estos metales en sus estructuras vegetales, principalmente en las raíces.

Las pasturas relacionadas con las familias Poaceae y Fabaceae, son las más frecuentes en estas zonas de estudio con 44,2 % y 24,4. Lo que demuestra algún grado de tolerancia

84 Evaluación del estrés abiótico en *Brachiaria spp.* Inducido por bioacumulación de cadmio y plomo, en una zona aledaña al corredor petrolífero de Barrancabermeja (Colombia)

a estrés por metales pesados, posiblemente se deba a procesos de adaptación de estas plantas a estos ambientes metalíferos.

La mayor riqueza de especies y de individuos se encontró en los transectos más alejados de las fuentes de contaminación, la refinería en el corregimiento del Centro de Barrancabermeja, y en la zona de Pozos de extracción en Casabe municipio de Yondó (Antioquia).

Quedo demostrado la adaptación de las pasturas brachiarias a estos suelos con persistencia alta de metales pesados en su primeros 5 centímetros, por consiguiente estas presentan bioacumulación de Cd y Pb sobre todo en sus sistemas radicales.

3.2 CARACTERIZAR LAS FISIOPATIAS ASOCIADAS A ESTRÉS POR CADMIO Y PLOMO EN *Brachiaria arrecta* BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO

RESUMEN

El objetivo fue evaluar en el tiempo los síntomas crecientes manifestados por toxicidad con Cadmio y Plomo en una pastura de trópico bajo. El estudio se llevó a cabo en el invernadero bajo un sistema hidropónico, en la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira en gramíneas sobre accesiones de *Brachiaria arrecta* (*B. radicans*), procedentes de zonas aledañas a campos contaminados por actividades petroleras con alternancia de actividades ganaderas en la región del Magdalena Medio Colombiano.

En campo la especie expresó diversos síntomas por estrés metalífero como hojas pequeñas y deformadas, lesiones cloróticas, alternando con coloraciones purpuras, hojas manchadas y desgastadas, crecimiento retardado en la hoja bandera y un pobre desarrollo de raíces. Se realizaron accesiones con este material vegetal, y se determinó por análisis clínico confirmativo la presencia y acumulación de los metales Cadmio y Plomo en tejidos de raíz, tallo, hojas y en suelo aledaño mediante análisis con un espectrofotómetro de absorción atómica en el laboratorio de fisiología vegetal.

Los resultados mostraron niveles variables de bioacumulación de estos dos metales, sobre todo en la raíces. En invernadero, se dopó el material vegetal sano con aplicaciones en “drench” con sales de CdCl_2 a 0.125 M a concentraciones de 1.5 y 10 ppm del metal, y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 0.5 M. a 150 y 500 ppm del metal, respectivamente. Como resultado, se describieron los síntomas crecientes por intoxicación por estrés inducido con el fin de diseñar con estas observaciones macro una escala de daños crecientes, a su vez mediante muestreo destructivo se reunió información morfofisiométrica complementaria sobre efectos del estrés severo por estos metales.

Palabras claves: Bioacumulación, Cadmio y Plomo, pasturas de trópico bajo, escalas daños crecientes, estrés abiótico.

ABSTRACT

The aim was to assess over time increased symptoms manifested by cadmium and lead toxicity in a pasture in tropical lowlands. The study was conducted in the greenhouse under a hydroponic system at National University of Colombia, Palmira in accessions of *Brachiaria* grasses on arrecta (*B. radicans*), from surrounding areas contaminated by oil fields with alternating livestock in the Magdalena Medio region of Colombia. In field the species express different metalliferous stress symptoms as small and deformed leaves, chlorotic spots, alternating with purple coloring, faded and worn leaves, retarded growth in the flag leaf and poor root development. Accessions were performed with this plant material was determined by confirmatory clinical analysis the presence and accumulation of these metals in tissues of root, stem, leaves and adjacent land by analysis with atomic absorption spectrophotometer in the laboratory of plant physiology. The results showed varying levels of bioaccumulation of these two metals, particularly in the roots. In greenhouse, doped healthy plant material with drench applications with salts to 0.125 M CdCl_2 at concentrations of 1.5 and 10 ppm of the metal, and $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 0.5 M. to 150 and 500 ppm of metal, respectively. Initial results, increased symptoms described by stress induced intoxication to design these macro feedback increasing a scale of damage in turn met by destructive sampling complementary morphometric information about effects of severe stress on these metals.

Keywords: Bioaccumulation, cadmium and lead, under tropical pastures, increasing damage scales, abiotic stress

3.2.1 Marco teórico

“En una época de engaño universal, decir la verdad es un acto revolucionario”.

George Orwell

Sanidad vegetal en cualquier contexto debe relacionarse con nutrición mineral balanceada. Donde estos elementos esenciales cumplan su papel de intervenir en reacciones químicas de transferencia de electrones (reacciones de óxido-reducción) dentro de las células, por ejemplo el cobre y el hierro, o la posibilidad de formar con otras moléculas, compuestos que intervienen en diversos procesos fisiológicos de los organismos.

Los metales poseen propiedades químicas que son indispensables para todo sistema viviente, pero a su vez algunas especies químicas pueden también convertirse en tóxicos cuando se encuentran en exceso, habiendo por consiguiente fisuras entre lo óptimo, lo deficiente y lo tóxico. Existen otros metales en los suelos y en los agroecosistemas (naturales o xenobióticos) que no cumplen funciones biológicas en las poblaciones vegetales, como el Cadmio, el mercurio o el Plomo, entre otros, y que son tóxicos, aún en concentraciones pequeñas (Carrasco, 2005).

Según Navarro y otros (2007), los componentes inanimados en los agroecosistemas, son componentes causantes de enfermedad (problema etiológico), que en ciertas circunstancias al ser manipulados por el hombre o por un evento natural inducen daños severos a la planta y pueden convertirse en un factor predisponente para el desarrollo de una enfermedad infecciosa en poblaciones vegetales.

Estos disturbios en las plantas o en sus poblaciones (cultivos) siempre están influenciados por la cantidad, calidad e intensidad de estos agentes, como puede ser uno o muchos metales tóxicos como: Cadmio, Plomo, Mercurio, Selenio, entre otros, que pueden condicionar y determinar etiologías simples de enfermedad abiótica o de predisposición a núcleos multiplex de complejos etiológicos, con efectos epidémicas sinérgicos con repercusión en toda la red trófica, y por ende en todo el sistema de Salud Pública (Pollard *et al.*, 2008).

Los patosistemas más estudiados en la ciencia fitopatológica a lo largo de su desarrollo histórico ha hecho referencia al estudio de componentes bio-ecológicos del tipo parasitario (enfermedad infecciosa) (Poland y Nelson, 2011), entre un hospedante y su huésped biótico, interactuando en medio de un ambiente altamente favorable e influenciado por la presencia del ser humano (Kranz, 2002). Su impacto es medido con base en utilizar diversos tipos de escalas gran parte de ellas diseñadas por Large (1966), que van desde la diagramáticas de severidad o escalas de índices de infección que estudian el progreso de las lesiones (Kerns y Pataky, 1997).

En los disturbios o enfermedades abióticas dichas escalas no han tenido desarrollo práctico en el campo fitopatológico, quizás por lo indeciso que puede ser el diagnóstico, al carecer de los principios de una simple o compleja prueba de patogenicidad o de parámetros infectivos como los periodos o eventos infecciosos como la latencia, la incubación, la colonización o el tiempo infeccioso de un tejido (Peláez, 2013).

Varios investigadores como: (Alam *et al.*, 2003; Grispen *et al.*, 2006; Puga *et al.*, 2006) han definido una fisiopatía, como una enfermedad no infecciosa cuyo agente causal es diverso y con expresiones sintomáticas igualmente diversas. Becerril y otros (2007), mencionan como la presencia de xenobióticos como los metales pesados, pueden desencadenar fisiopatías. Estos investigadores por lo general, solo estudian el fenómeno de la bioacumulación y como se afecta algunas funciones fisiológicas en la planta como la nutrición vegetal y la fotosíntesis, entre otras.

En fitopatología es de uso común parametrizar el impacto de una enfermedad de naturaleza biótica, mediante el uso de escalas diagramáticas para fines de control o monitoreo. Sin embargo estas metodologías no aplican o se utilizan poco para evaluar fisiopatías, disturbios o daño fisiológico en cultivos y menos en pasturas, que direccionen un estudio epidemiológico. (Zadok y Shein, 1979). En este sentido, hasta el momento solo se conoce para enfermedades abióticas, las escalas de daños por herbicidas, desarrolladas por la Asociación Latinoamericana de Malezas ALAM. Esta escala fue utilizada por Medrano y otros (1997), para evaluar daños por herbicidas en plantaciones de soya (Cuadro 8), esta escala arbitraria como todas las diseñadas en patología vegetal,

representa quizás la una única escala estimativa por estos daños abióticos, donde no se especifica un rango de cultivo o agroecosistema. Su fundamenta radica en los cambios que se suceden en la planta por efecto de la aplicación de un herbicida, comparándose esto con una escala que va desde cero (0) correspondiente a ningún daño hasta diez (10) que corresponde a muerte total (Medrano *et al.*, 1997).

Cuadro 8. Escala de evaluación de daños, por aspersion de herbicidas

Índice	Denominación	Descripción del daño
0	Ningún daño	Ningún efecto, apariencia similar al testigo.
1	Ningún daño	Leve clorosis y retardo en el crecimiento.
2	Daño leve	Leve clorosis, retardo en el crecimiento, fallas en la germinación.
3	Daño leve	Clorosis más pronunciada, manchas necróticas, malformaciones.
4	Daño leve	Clorosis intensa, necrosis y malformaciones más pronunciadas, el cultivo si se recupera.
5	Daño moderado	Los síntomas son más marcados, el cultivo si se recupera lo hace con dificultad.
6	Daño moderado	La fitotoxicidad se manifiesta, el cultivo por lo general no se desarrolla bien.
7	Daño moderado	Severo daño al cultivo, pérdida de plantas.
8	Daño severo	Muerte significativa de plantas, pocas plantas logran sobrevivir.
9	Daño severo	Muerte casi total de las plantas.
10	Muerte total	Destrucción del cultivo, muerte de todas las plantas.

Fuente: ALAM. 1974. Revista de la Asociación Latinoamericana de Malezas. Método de Evaluación de Control de Malezas en Latinoamérica. II Congreso de ALAM, Cali, Colombia. Enero. pp. 6-12

Dentro de los alcances de esta tesis, está en diseñar una escala valorativa para fisiopatías cuya causa sea la presencia de metales pesados como Cadmio y Plomo que sean causas de toxicidad, y que sea de fácil analogía para otros tóxicos xenobióticos.

Se hace énfasis en aspectos relacionados con la caracterización de los cuadros fisiopáticos asociadas a estrés bajo condiciones de invernadero en una especie representativa como *Brachiaria arrecta* sinónimo (*B. radicans*) y que reposa como la accesión 6020 en el banco de germoplasma del CIAT en Palmira Colombia. Esta pastura es muy frecuente en estas zonas de trópico en el Valle del Rio Magdalena, muy tolerante a suelos inundados. En el estimado previo de pastos, se encontró a *B. arrecta* en los suelos aledaños a la estatal petrolera Ecopetrol se encuentra alternando con sistemas de producción de ganadería intensiva. Por último se estiman parámetros morfofisiométricos que complementen la discusión en cuanto al estrés por estos dos metales y algunas

similitudes en síntomas de deficiencias nutricionales como un alteración colateral ante el disturbio fisiológico provocado por el xenobiótico que desplaza o reemplaza al nutriente esencial alterando las funciones básicas para la pastura (García, 2006, García *et al.*, 2011).

3.2.2 Trabajos relacionados

Casado *et al.*, (2007) en un estudio sobre la aplicación de lodos de depuradora compostada en parcelas de pimiento en campo y en macetas en invernadero encontraron que con aplicaciones de 9 kg/m² de compost se promovió la aparición de un efecto deletéreo sobre las propiedades del suelo, tales como la acumulación de sal, un aumento significativo de la conductividad eléctrica y una entrada de metales pesados (Pb > Cr > Cd), afectando el suministro de nutrientes necesarios para cultivar estas plantas relacionado con la producción de biomasa bruta en invernadero que fue de casi 60% mayor en comparación con el tratamiento de campo al aire libre. Las investigaciones realizadas por Casado y su grupo, concluyeron que se presentó reducción en los contenidos de Ca y aumento de los niveles de Cu, sumado a la aparición de una podredumbre apical, que afecta a más del 10% de los frutos cosechados.

Oancea *et al.*, (2005) investigaron efectos deletéreos cuando aplicaron nitrato de Plomo en plantas de ají -*Capsicum annum L.*- observando alteraciones en las actividades bioquímicas y en las funciones en la planta, señalando como el nitrato de Pb incrementa el contenido de pigmentos fotosintéticos pero no se observaron modificaciones en la altura o biomasa de las plantas.

García y colaboradores en el 2011, condujeron bioensayos en invernadero donde probaron diferentes concentraciones de Plomo en plantas de haba y avena, para determinar factores de bioconcentración y translocación en el sistema suelo-raíz y parte aérea. Estos investigadores doparon a estas plantas a concentraciones de 50, 100 y 150 mg·Pb·kg⁻¹ de suelo, incluyendo un control. Las variables que determinaron 60 días después de la siembra en esta investigación fueron: altura de planta (AP), volumen radical (VR) y

biomasa seca total (BST), sumado al contenidos de Pb en suelo, raíz y parte aérea. Estos investigadores encontraron que estas plantas de haba y avena absorben cantidades de 55 mg·kg⁻¹ y 45.3 mg·kg⁻¹, respectivamente, siendo niveles tóxicos para plantas cultivadas.

Según Bustamante (2012), investigaron posibles fisiopatías asociadas a presencia de sustancias xenobióticas como el tóxico cipermetrina usada para el control de Homópteros: cercópodos que son plagas como miones o salivasos, en muchas pasturas tropicales como: pasto kikuyo -*Pennisetum clandestinum*-, pasto estrella -- *Cynodon nlemfluensis*- y pasto peludo -*Brachiaria decumbens*-, con técnicas de microscopía óptica de alta resolución se identificaron algunos daños como diferenciación de tejidos, y respuestas del sistema celular ante la presencia de la sustancia extraña como el engrosamiento de paredes celulares, formación de capas de corcho.

3.2.3 Materiales y métodos

- **Localización.** La investigación se llevó a cabo en el invernadero ubicado en la Universidad Nacional de Colombia en la ciudad de Palmira, Valle del Cauca, Colombia (1050 msnm, 23.5° C; humedad relativa del 77%; precipitación anual de 1174 mm; evaporación de 1640,4 mm por año). La información microclimática en el invernadero durante el desarrollo de la investigación registro los siguientes intervalos ambientales: H.R. promedio fue de 60% (38 - 79%) y la temperatura promedio 31° C (22-39° C).
- **Material vegetal.** El material vegetal se obtuvo a partir de la recolección y acceso de plantas de *Brachiaria arrecta* (Poaceae), provenientes de la zona de estudio donde se realizan actividades petroleras en los campos industriales de exploración de Pozos en Casabe en el municipio de Yondó, Antioquia (N 7.039775, W -73.918277) y el campo de Refinería de Ecopetrol en el corregimiento del Centro en Barrancabermeja (N 6.937722, W-73.761419) en el Magdalena Medio Colombiano, en ambas zonas se encontró bovinos pastoreando. Con el material vegetal recolectado se realizaron las accesiones correspondientes y se creó un banco de plantas madres para las siguientes etapas de la investigación. Las muestras fueron tomadas siguiendo la metodología propuesta por Sánchez (2010), consistente en recolectar material vegetal, empleando bolsas plásticas

con sellado hermético, las cuales se enviaron refrigeradas para evitar la fuga de algún sustancia volátil.

En el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia Sede de Palmira se realizó la fase diagnóstica, donde se determinó cantidad total de metales pesados en suelos y en los tejidos vegetales de raíz, tallo y hojas. El material de campo fue analizado con un espectrofotómetro de absorción atómica (Varian Spectra AA- 20FS) utilizado para la determinación de los metales, el cual está equipado con una lámpara de cátodo hueco, apropiada para cada elemento, y una lámpara de deuterio para la corrección de fondo. Las condiciones analíticas para la cuantificación de los metales totales mediante la técnica EAA de llama. La longitud de onda utilizada fue la recomendada para cada elemento, de manera que se obtuvo una mayor sensibilidad, reportando valores expresados en miligramo/ kilogramo (ppm) para cada metal.

En la etapa de invernadero se conservaron las plantas de *Brachiaria arrecta*, para las posteriores fases de evaluación. Una vez que se obtuvo las plántulas de 20 días propagadas en sustrato de turba para lograr un enraizamiento vigoroso, como etapa previa al establecimiento del cultivo hidropónico siguiendo la metodología de Shannon *et al.*, (2009), de la Universidad de Missouri- Culumbia con modificaciones, consistentes en cultivo hidropónico, utilizando vasos de 120 centímetros cúbicos como contenedores rellenos con arenas de cuarzo o sílice (Contenido de SiO₂ de mínimo 95%, los cuales se ubicaron en una bandeja de vidrio con 6 vasos sumergidos en la solución nutritiva de Hoagland con la siguiente composición de sales: 0.20M NH₄H₂PO₄, 0.50M NH₄NO₃, 1.15M Ca(NO₃)₂, 0.26M CaCl₂, 0.20M MgCl₂·6H₂O, 0.20M Mg(NO₃)₂·6H₂O, 0.40M MgSO₄·7H₂O, 0.20M KH₂PO₄, 1.20M KNO₃, 0.50M K₂SO₄, 0.040M FeCl₃·6H₂O, 1.2 x 10⁻²M H₃BO₃, 1.2 x 10⁻⁴M CuCl₂·H₂O, 2.3 x 10⁻³M ZnCl₂, 4.4 x 10⁻⁴M MnCl₂·4H₂O, 6 x 10⁻⁶M Na₂MoO₄·H₂O, EDTA y FeSO₄·7H₂O, con un pH= 6 (Resh, 2001), (Figura 10).

- **Observaciones fisiopáticas.** Los análisis fisiopáticos macro correspondieron a evaluar y confirmar respuestas a daños inducidos como: resistencia, susceptibilidad o tolerancia (respuesta en términos de recuperación de las accesiones evaluadas de *Brachiaria arrecta*. Las plantas fueron sometidas a estrés por dopaje con concentraciones medias y

anómalos de estos dos metales pesados en sales (Cuadro 9), aplicado en “drenchs” sobre los cuellos en los tallos de las plántulas que reposaban en el sustrato compuesto por arenas de cuarzo, siguiendo la metodología de Brown y Hock.(1988). Las concentraciones en los sustratos se hicieron con base a los criterios internacionales, se tomaron niveles de Cadmio a 1.5 y 10 ppm y para Plomo de 150 y 500 ppm, que están dentro de los rangos de niveles permitidos y niveles tóxicos respectivamente en plantas cultivadas para suelos contaminados, según Doce (2001), como anormal hasta 30 ppm. Para Plomo como anormal hasta ≥ 720 ppm.

En conjunto el diseño fue por bloques completamente al azar de siete tratamientos, seis plantas y cuatro repeticiones y para un total de 168 observaciones.

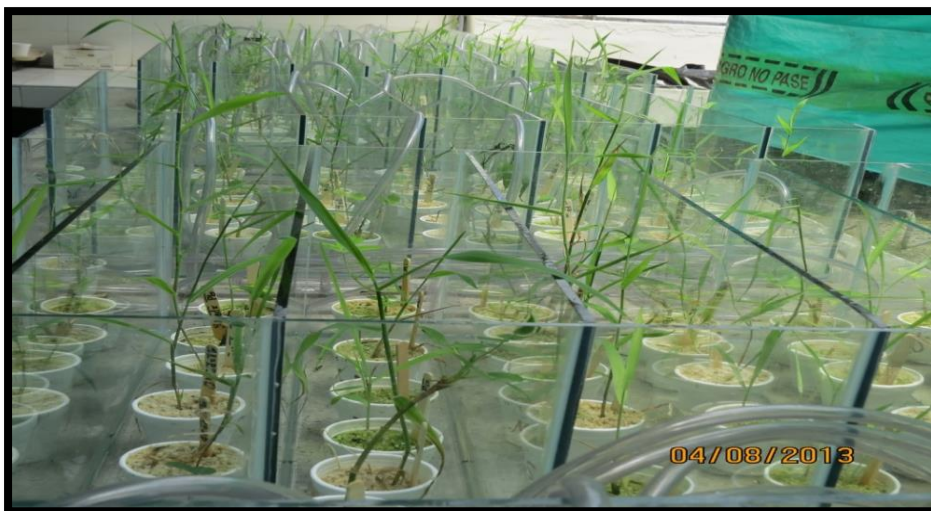
- **Observaciones de síntomas macro en tejidos.** Las observaciones sobre los daños fitotóxicos inducidos por los tratamientos fueron evaluados siguiendo una escala de reacciones crecientes diseñada y propuesta por el investigador como resultado de este estudio. Ante la no existencia de otras escalas comparativas similares con parámetros fisiopáticos donde se tuvieran en cuenta interacciones planta- (patógeno-abiótico) o disturbio fisiológico por el estrés metalífero en pasturas de trópico, especialmente agroecosistemas de *Brachiaria*.

94 Evaluación del estrés abiótico en *Brachiaria spp.* Inducido por bioacumulación de cadmio y plomo, en una zona aledaña al corredor petrolífero de Barrancabermeja (Colombia)

Cuadro 9. Tratamientos aplicados en el estudio.

Tratamientos	Notación	Nivel en sustrato arena cuarzo	Concentración ppm o (mg/kg)
1	Cd medio	permitido	1.5 ppm
2	Pb medio	permitido	500 ppm
3	Cd medio x Pb medio	permitido	____; ____
4	Cd alto	anómalo	10 ppm
5	Pb alto	anómalo	500 ppm
6	Cd alto x Pb alto	anómalo	____; ____
7	Testigo (blanco)		solución nutritiva, sin el M.P.

Fuente: Peláez, M. 2013.



Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 10. Detalle del montaje del diseño experimental en invernadero bajo un sistema hidropónico.

- **Medición de variables morfofisiométricas.** La información recolectada sobre el material vegetal dopado en el invernadero, se contrastó con la evaluación de variables morfofisiométricas como peso fresco planta, peso seco planta, peso raíz fresco, peso raíz seco, longitud raíz, longitud total, área foliar, diámetro de raíz, volumen raíz, y potencial hídrico. Las mediciones se realizaron con la ayuda de instrumentación del laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia y el empleo de Software adecuado: Los pesos frescos y secos se obtuvieron mediante mediciones en balanzas digitales. Las mediciones de área foliar y de raíces con los programas – ImageTool desarrollados por el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas en San Antonio bajo licencia libre (Bauhaus y Messier, 1999). El potencial hídrico se determinó en MPa y se midió mediante el empleo de una cámara de presión Scholander. Se realizaron análisis foliares en el laboratorio de química de suelos de la Universidad Nacional de Colombia con el fin de apoyar los resultados mediciones morfofisiométricas y observar posibles desbalances nutricionales en lo materiales expuestos a las concentraciones de los metales Cd y Pb. La metodología para esta determinación se realizó con los protocolos que sigue este centro de diagnóstico y fueron comparados con el laboratorio de referencia internacional A-L S.A. de C.V. de México 2011, para pastos y forrajes de trópico (Cuadro 10 y 11).

- **Análisis estadístico.** Los análisis de variables morfofisiométricas que midieron el impacto tóxico de los metales pesados Cadmio y Plomo por separado y las mezclas descritas en cuadro 9. Fueron dispuestos en un diseño completamente al azar, donde las unidades de experimentación fueron las cubetas tratadas y las unidades de observación las plantas expuestas (dopadas en concentraciones medias y anómalas) (Figura 10). Se realizaron los ANOVAS respectivos para medir el efecto de los tratamientos sobre las variables morfofisiométricas y se establecieron pruebas de medias de Bonferroni para comparar diferencia entre y dentro de los tratamientos cuando se presentó efectos significativos sobre la respuesta.

Cuadro 10. Protocolos Análisis Foliare

METODOLOGIA:

Nitrógeno: Kjeldahl (Titulación)	Bases (Ca, Mg, K, Na): Acetato de Amonio 1 Normal (Absorción Atómica)
Boro: Hunter (Espectrometría)	Elementos Menores (Cu, Zn, Mn, Fe): Acetato de Amonio 1N Neutro y EDTA 0.01M (Absorción Atómica)
Fósforo: vanadato –Molibdato de amonio. (Espectofotometría)	

Fuente: Laboratorio Química de Suelos Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira

Cuadro 11. Niveles de referencia en análisis foliares para pastos y forrajes de trópico.

	N	S	P	K	Mg	Ca	Na	B	Zn	Mn	Fe	Cu	Al	Mo
	PORCENTAJE (%)							PARTES POR MILLON (ppm)						
Desde	2.00	0.20	0.30	2.00	0.20	0.40	0.02	10	25	30	50	5	25	—
Hasta	3.00	0.50	0.60	4.00	0.40	0.80	0.15	20	60	200	300	20	250	—

Fuente: Laboratorios A-L S.A. de C.V. 2011. Guía de Análisis de la Planta (Rangos de Suficiencia de Nutrientes).

3.2.4 Resultados y discusión

- **Observaciones síntomas macro.** Antes de mostrar los estadios crecientes por toxicidad de Plomo y Cadmio sintetizados en la escala y su cuadro explicativo, se presenta en breve lo explorado en los campos aledaños a los pozos de Casabe en Yondó (Antioquía) y del Campo de refinería en el corregimiento del Centro en Barrancabermeja (Santander), donde se encontró la especie de *B. arrecta*, mostrando una sintomatología asociada a un estrés abiótico, posiblemente por metales pesados (Abollino *et al.*, 2001). En la Figura 11. Resultados “in situ” para lo correspondiente a los estudios de análisis de suelos para metales pesados y de componentes vegetales, analizados con el espectrofotómetro de

absorción atómica de la Universidad Nacional Sede Palmira. Todas las especies presentaron presencia de ambos metales, coincidiendo con los resultados de Pastor y Hernández (2008), que mencionan que en pasturas de Galicia (España) cercanas a minas de Calcopirita, dichos forrajes bioacumulaban dos metales tóxicos. Estos resultados ayudaron a un diagnóstico presuntivo de campo.

Los síntomas en campo mostraron ligeras deformaciones de los limbos foliares, algunas coloraciones purpuras desde el centro de las hojas hacia las puntas, el cual podría confundirse con deficiencias de Fósforo, resultados similares a los encontrados por Canchila *et al.*, 2010, cuando evaluó accesiones diferentes procedentes de CIAT.



Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 11. Plantas de *B. arrecta* mostrando síntomas fisiopáticas en campo.

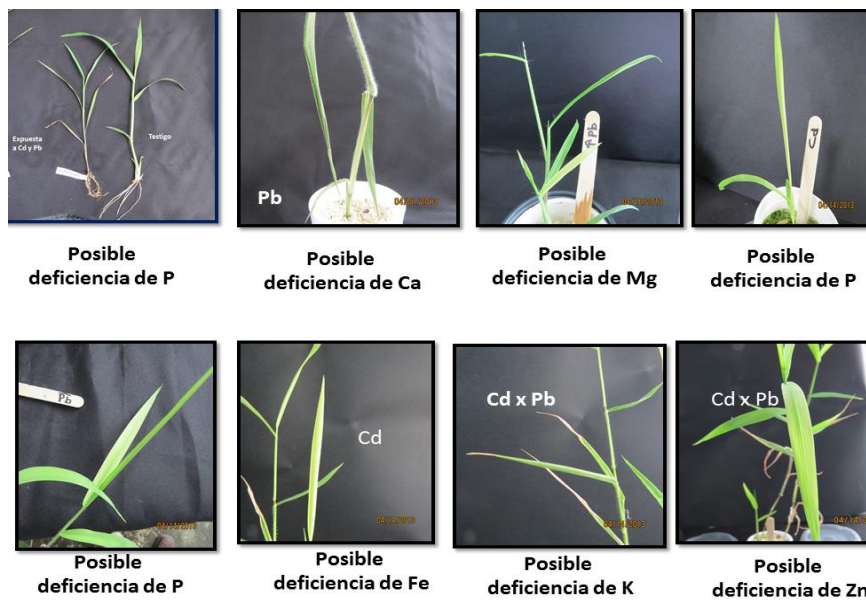
Los resultados en el invernadero cuando se doparon con las sales de 0.125 M CdCl_2 (cloruro de Cadmio) a una concentración de 1.5 y 10 ppm y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 0.5 M. (nitrato de Plomo) a una de 150 y 500 ppm. Mostró sintomatologías igualmente diversa, la cual podría confundirse con algunos síntomas de deficiencia nutricional (Figura 11). Cuando las plantas sufren una disponibilidad insuficiente de nutrimentos, expresan unas características anormales visibles específicas para ese elemento (Brady y Weil, 2002). Para descartar posibles enmascaramientos por la toxicidad metalífera inducida, se realizaron análisis foliares a estas muestras, incluyendo el testigo que aparecen en el cuadro 3.

En las Figuras desde la 13, hasta la 17 se presentan resultados sobre los detalles sintomáticos de las plantas cuando se doparon con los tratamientos evaluándose este fenómeno a las 72 horas (3 días después) y 168 horas (7 días después) respectivamente, una vez que ya se han bioacumulado y bioconcentrado los tóxicos (Kabata y Pendías, 2004).

Las fisiopatías inducidas por el estrés por metales pesados pueden ser un factor de predisposición a otros problemas de naturaleza biótica o abiótica, donde se ocasione desbalances nutricionales, caídas en tasas fotosintéticas y de transpiración, entre otros. Bergmann (1992), menciona que el estrés vegetal condiciona síntomas de deficiencia que pueden resultar de un estrés sobre la planta no relacionado a la nutrición. Los metales pesados entran en la categoría de ser entonces xenobióticos que aminoran la habilidad de la planta a obtener los nutrientes esenciales, aunque estos existan en niveles adecuados en el suelo, hecho este controlado con el suministro de la solución de Hoagland.

En el invernadero donde se llevó a cabo esta investigación resultó evidente que las plantas expuestas al cabo de las 72 horas mostraran tempranamente síntomas por el estrés metalífero severo al que estuvieran sometidas. Inicialmente estos síntomas podrían confundirse inicialmente con desbalances nutricionales como la disminución del crecimiento, ligeros amarillamientos de las hojas (clorosis), necrosis, rayados que son algunos síntomas muy visibles en las plantas que crecen en suelos con alta concentración de metales que inducen estrés nutricional a consecuencia de la presencia del patógeno abiótico. Fue notorio el decaimiento de las hojas en relación al testigo en los tratamientos que contenían las sales CdCl_2 y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en 10 ppm y 500 ppm, respectivamente (Figura 11 y 12). En hidroponía o en suelo las plantas hacen contacto mediante la raíz con una zona superficial llamada rizosfera (1– 2 mm), esta región es un contorno muy activo biológicamente hablando (Strong y Phillips, 2001; Sánchez, 2007). Es a través de esta zona que la planta absorbe tanto los nutrientes como los contaminantes que se encuentran disponibles en la solución del suelo o para este el caso la solución hidropónica (Marschner, 1995). El fósforo es vital para el crecimiento y la salud de las plantas, asiste en la conversión de la energía del sol y otros químicos, como el nitrógeno, en la nutrición vegetal

apropiada. El porcentaje de fósforo asimilable en éste trabajo presentó valores bajos con todas las aplicaciones de metales pesados, con valores que oscilaron entre (0,001 y 0,002) en relación con lo reportado por CIAT (1982) como un nivel crítico en estrés por sequía o inundación (0,08 y 0,05) para las especies *Brachiaria: humidicola, brizantha y decumbens*, y si se compara con los niveles de referencia internacional para análisis foliares en pastos y forrajes de trópico registrados por A.L.S.A. (2011), que son para el porcentaje de Fósforo de (0,30 a 0,60). Esto indica que no hay solubilización y absorción de este elemento en relación a las plantas expuestas a los metales Cd y Pb, ocurriendo entonces una alteración en los niveles de Fósforo lo que condiciona a una situación de estrés metalíferos mostrando dichas pasturas una apariencia poco vigorosas y decaimiento. Marschner (1995), señala que el efecto más acentuado de la falta de P es la reducción en el crecimiento de la hoja así como en el número de hojas, siendo el crecimiento de la parte superior más afectado que el crecimiento de la raíz (Abollino *et al.*, 2001).



Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 12. Plantas de *B. arrecta* intoxicadas con Ca y Pb. Mostrando síntomas similares a posibles deficiencias nutricionales.

No obstante, puede presentarse marcadamente en condiciones de deficiencia de P un menor volumen radical. Marschner (1995), menciona que estando este elemento en déficit es posible que ocurra un estrés que deprime los procesos de utilización de carbohidratos, aunque la planta siga haciendo fotosíntesis y produzca estos compuestos.

Como proceso detrimental resultante es una acumulación de carbohidratos y la aparición de un color verde oscuro en las hojas. Se sabe que el P es fácilmente movilizado en la planta, cuando se presenta deficiencias, este nutriente se transloca de los tejidos viejos a tejidos meristemáticos activos, apareciendo entonces los síntomas en las hojas viejas (parte baja) de la planta (Figura 12).

Para el caso de las brachiarias y otras gramíneas se manifiesta el desarrollo de un color violáceo o púrpura, síntomas evidenciados en esta investigación en los bioensayos probados, y que posiblemente se asocie a lo observado en *B. arrecta* en condiciones de campo en las zonas aledañas a los campos petrolíferos (Figuras 11 y 12.).

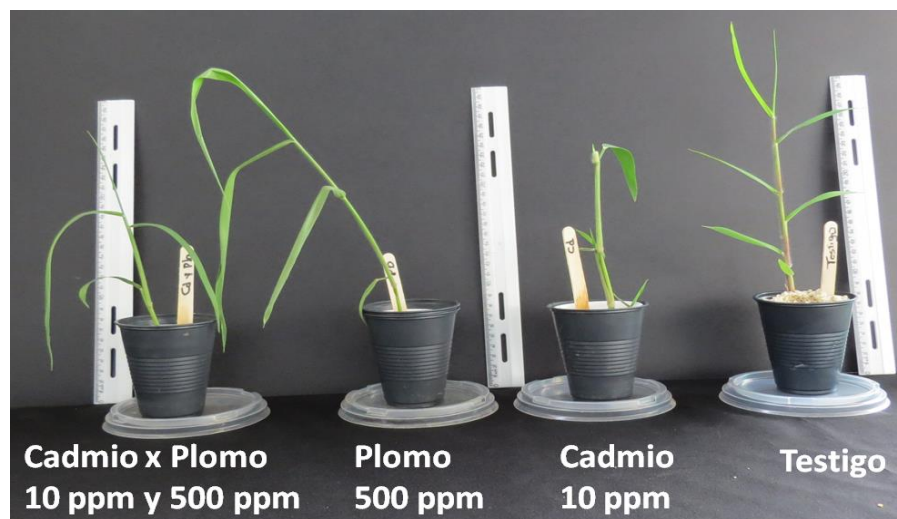
En relación al calcio, este se ve drásticamente afectado por sus valores porcentuales bajos (0,005; 0,006 y 0,003), comparados con lo reportado por CIAT (1982) para *B. humicola* (0,22 % y 0,25 %) y *B. decumbens* (0,37 % y 0,30%) en situaciones de estrés hídrico. A.L.S.A. (2011), reporta como referente (0,40 % y 0,80 %). Por consiguiente los resultados observados en esta prueba o bioensayo en el presente estudio (Cuadro 13.), probablemente pueden deberse a que en condición de estrés severo por Cd y Pb, disminuye la actividad iónica de elementos como el calcio en la solución, como también es probable que estos metales ocasionen la precipitación tanto del fósforo como del calcio y por consiguiente no contribuya exitosamente hacia los procesos de adsorción y absorción por medio de los sistemas de raíces (García y Dorrnsoro, 2005).

Numerosos investigadores, coinciden que el catión Pb^{2+} desplaza o bloquea la entrada de otros cationes a las plantas como K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} y de aniones como NO_3^- en el sistema radical generando desequilibrios nutricionales y como resultado se expresen en los tejidos de las plantas, y en funciones integradas al crecimiento y vida celular (Mench y Martin, 1991; Salt *et al.*, 1995; Krishnamurti *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2003; Wensel *et al.*, 2003; Kabata y Pendías, 2004; García, 2006, Bernard, 2008).

Cuadro 12. Análisis foliares a plantas intoxicadas con metales pesados [Cd 10 ppm, Pb 500 ppm y en mezcla (Cd 10 ppm y Pb 500 ppm)]

Lotes expuestos	Cadmio	Plomo	Cadmio y Plomo
Cultivo	<i>B. arrecta</i>	<i>B. arrecta</i>	<i>B.arrecta</i>
Nitrógeno (%)	3.11	3.64	5.42
Calcio (%)	0,005	0,006	0,003
Magnesio (%)	0,015	0,014	0,016
Potasio (%)	0,137	0,130	0,041
Sodio (ppm)	0,02	0.01	0.01
Fósforo Asimilable (%)	0,002	0,001	0,001
Cobre (ppm)	4,74	4,23	3,12
Zinc (ppm)	24,80	34,41	23,42
Manganeso (ppm)	35,89	43,99	11,32
Hierro (ppm)	91,85	97,26	74,18
Boro (ppm)	16.25	10,05	9.00

Fuente: Peláez, M. 2013.



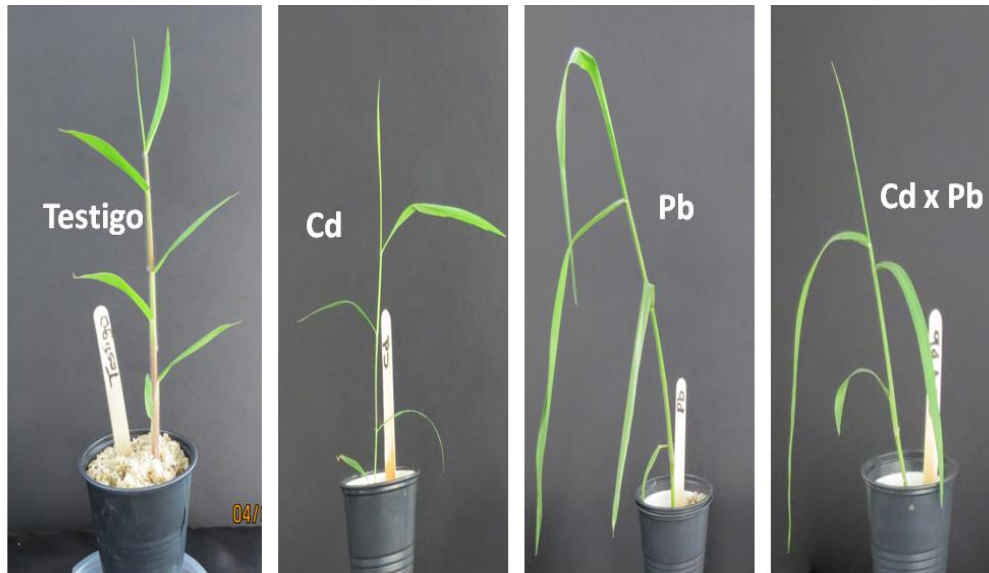
Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 13. Pastura de *B. arrecta* dopadas con sales de Cadmio y Plomo, 72 horas después.

En este experimento, las plantas crecieron directamente en un sustrato inerte el cual sirvió como contacto entre las raíces de *B. arrecta* y la solución hidropónica durante las tres semanas en que se aclimataron las plantas al sistema. En las Figuras 13, 14 y 15. Se puede apreciar detalles de la sintomatología inicial que pueden desencadenar estos dos metales, apenas con 2 días de haber sido dopadas. Nótese como la hoja bandera tiene retardo en aparecer en el tratamiento que contiene la sal $Pb(NO_3)_2$ empleada en la Figura 13. La planta una vez experimenta el estrés severo por parte catión plumboso Pb^{2+} , la gramínea no tolera el metal decayendo tempranamente (Cobb *et al.*, 2000). Además se presenta un ligero enrollamiento de sus limbos foliares, y ocurre una deformación progresiva en sus bordes hacia el centro de la hoja. A la vez que las hojas bajas, pierden su color natural y se deforman tempranamente, deteniendo su crecimiento (Sangar *et al.*, 2008).

En la Figura 14. Aparecen las plantas intoxicadas con una sal como el cloruro de Cadmio ($CdCl_2$), mostrando en sus componentes vegetativos aéreos síntomas marcados como necrosis severas en sus puntas, ligeras clorosis en su hoja bandera y deformación de las hojas normales por la transformación de látigos por encogimiento de las hojas, al parecer por bloqueo en la entrada de elementos como el calcio. Varios autores explican que a una deficiencia de Ca, es una consecuencia de la toxicidad un metal pesado como Cadmio o Plomo, que induce una fisiopatía (Pandey *et al.*, 2009), con consecuencia directa en la constitución de la pared celular, afectando los pectatos de la misma (Seregin e Ivaniov, 2001).

Por lo tanto se comprobó la eficiencia del sistema hidropónico de Shannon ligeramente modificado que se utilizó en esta investigación como masa conductora de los nutrientes y de los tóxicos, garantizando la intoxicación por los metales Cadmio y Plomo cuando las plantas fueron dopadas, aunque si bien estos metales pueden ser poco móviles, una vez que se absorben por las raíces al quedar estas desprotegidas de su suelo rizosférico y al encontrar un sustrato inerte, ocurre eliminación de la barrera inicial la cual es una defensa en la planta con sus exudados radicales ricos en sustancias quelatantes (Sánchez *et al.*, 2007, Quartacci *et al.*, 2009).

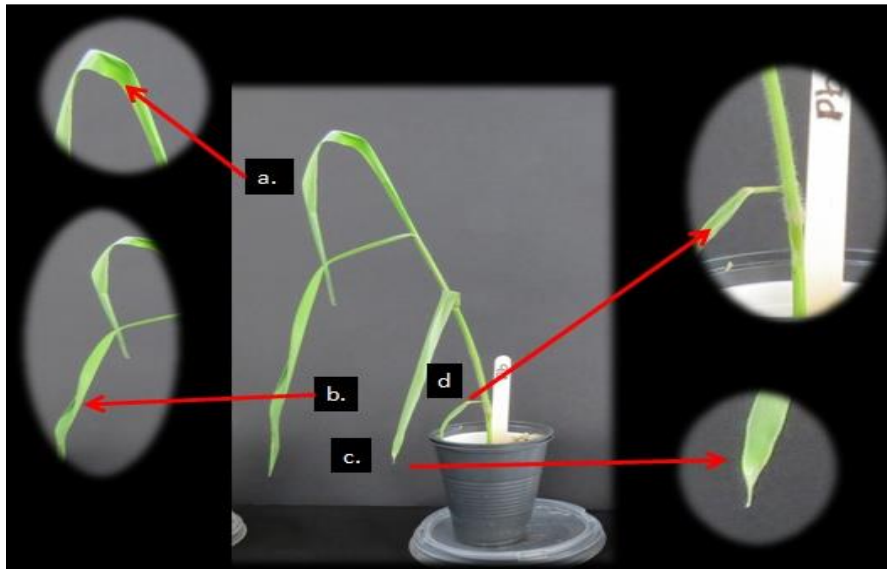


Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 14. Detalles de las pastura *B. arrecta* dopadas con Cd, Pb y Cd x Pb, 72 horas después.

En la Figura 15, se presenta el efecto de la sal $Pb(NO_2)_3$ en el experimento, apreciándose en el cuadro sintomático un cúmulo muy representativo de los disturbios (cuadro 12), como las hojas deformadas tipo látigo, decaimiento de las hojas, ligeras clorosis en las hojas banderas, y una tenue deformación de los limbos foliares.

Ahora, se aprecia de acuerdo a éstos resultados mostrados visualmente en las figuras (15 y 16), como un estrés metalífero intenso (agente causal patogénico) puede ser la resultante de múltiples síntomas de deficiencias nutricionales como efectos (disturbio), explicado sobre la toxicidad de los metales que pueden impedir que la planta absorba el verdadero nutriente esencial para su normal funcionamiento (fenómeno de sustitución), esto implica que ante procesos acumulativos de xenobióticos como sales o similares, sea entonces posible la inducción de un estrés nutricional sobre la planta (Labanowski *et al.*, 2008). Es evidente que al hacer la descripción de estos síntomas foliares, por lo fuerte del estrés metalífero, ocurra disfuncionalidad temprana como consecuencia del fenómeno de la bioacumulación en los tejidos lo que impide que la planta acceda a sus necesidades como sistema viviente, presentando poca adaptación y desajuste en su metabolismo (Taiz y Zeiger, 2009).



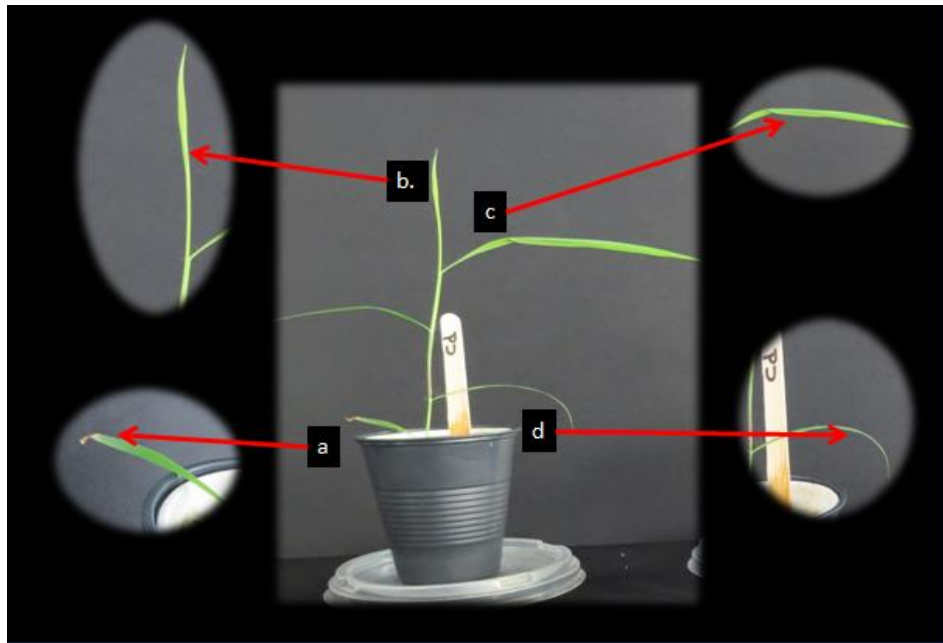
Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 15. Síntomas detallados en planta y ampliación de los mismos por estrés temprano a 72 horas del dopaje por Plomo (Pb) en *B. arrecta*: a. se presenta retraso en la aparición de la hoja bandera; b. encogimiento del limbo foliar, c. aparece una necrosis en las puntas. D. hay deformación de limbo foliar.

En este estudio la metodología controlada del estrés metalífero fue apropiada para que la especie *B. arrecta* rompiera con la homeostasis, ya que se comprometió la adquisición de nutrientes esenciales, se interrumpió el transporte de nutrientes esenciales en la conformación de los tejidos, y se agotó las posibles reservas, fuentes de producción y transformación de energía química en la planta (Zulak *et al.*, 2010). (Figuras 18,19 y 20).

Las implicaciones en las que posiblemente pueda inferir esta escala visual y descriptiva, sea de utilidad diagnóstica para una especie vegetal en este caso una Poaceae como *B. arrecta* para fines de estrés o tolerancia ante la contaminación por el xenobiótico, con fines de fitorremediación o manejo preventivo de interés en Salud Pública, como quiera que en el consumo de estas pasturas por parte de los herbívoros, se pueda comprometer la red trófica incluyendo a los consumidores de estos últimos los seres humanos que están asentados en los centros de mercado, desconociendo como puede estar afectada su salud, (Llugany *et al.*, 2007).

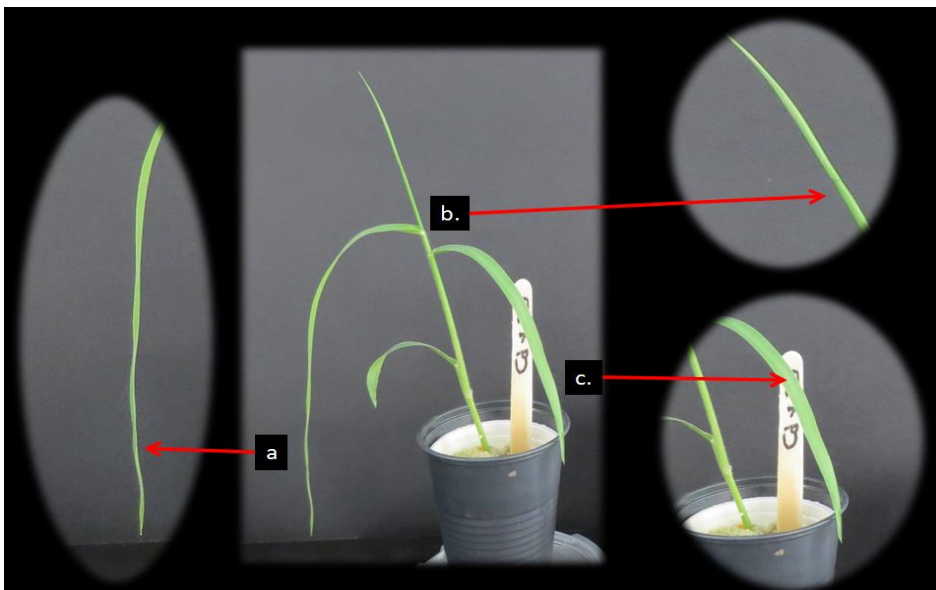
La inducción artificial de metales como Cadmio y Plomo en estas pasturas debe ser el camino correcto para entender los problemas epidemiológicos multi-casuísticos y de las soluciones con tratamientos preventivos posibles desde la corrección de ambientes químicos en la nutrición vegetal y la fitorremediación del suelo mismo (Taiz y Zeiger, 2005). Los suelos son el mayor reservorio de Pb desde donde este es absorbido y se bioacumula por las plantas y animales que finalmente pueden ser consumidos por los seres humanos.



Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 16. Síntomas detallados en planta y ampliación de los mismos, por estrés temprano a 72 horas del dopaje por Cadmio (Cd) en *B. arrecta*: a. se presenta necrosis en las puntas sobre todo en las hojas bajas; b. la hoja bandera permanece eréctil pero muestra una ligera clorosis; c. las hojas superiores se doblan aunque no pierde su color verde natural; las hojas bajas pierden textura y se forman látigos al enrollarse a consecuencia del estrés.

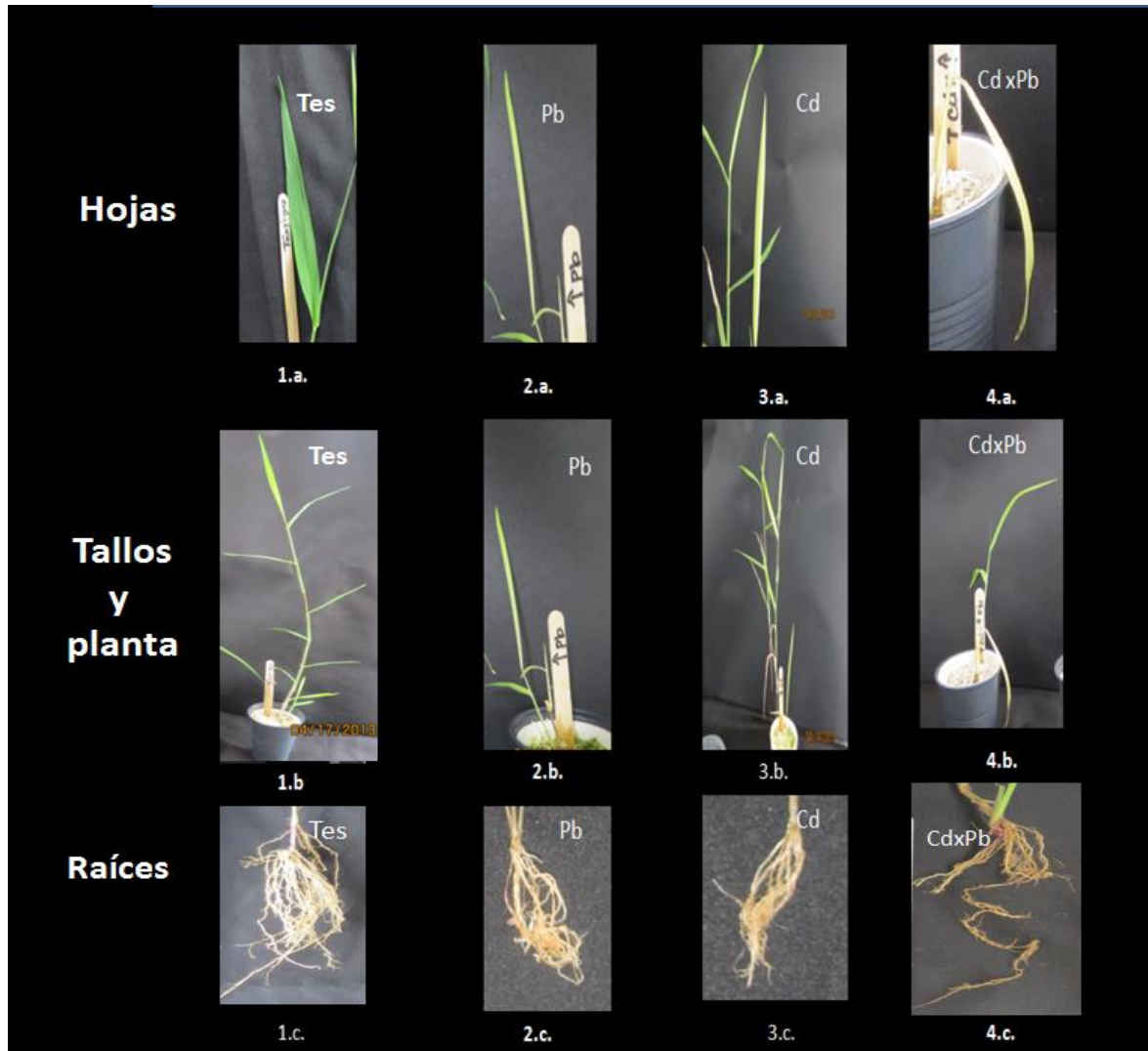
Los agentes tóxicos como el Cadmio y el Plomo en este estudio hacen perder su función biológica específica de todos los tejidos en la planta, por lo tanto se puede bloquear la presencia de elementos esenciales como el Calcio, que es un constituyente fundamental en la pared celular. Wierzbicka (1998-1999), hace una crítica oportuna sobre el progresivo aumento de la contaminación ambiental por residuos y elementos tóxicos que llegan y alteran la salud de agroecosistemas y en general de comunidades, por lo que hay que profundizar en investigaciones sobre niveles enzimáticos y moleculares en muchas plantas como marcadores cuando se encuentran en situaciones de estrés ambiental por salinidad, sequía, aluminio y metales pesados, esto dará entonces pautas en cuanto a lo que es posible cultivar o no (en términos de tolerancia, resistencia o susceptibilidad de la población vegetal ante el problema de suelos contaminados por presencia de metales pesados), en la medida que la investigación en mejora genética vegetal convencional o no convencional incorpore alternativas en la bioprospectiva de los acervos genéticos.



Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 17. Síntomas detallados en planta y ampliación de los mismos por estrés temprano a 72 horas, del dopaje combinado de las sales de Cadmio y Plomo en *B. arrecta*: a. hay presencia de látigos en las hojas altas; b. la hoja bandera permanece eréctil pero muestra una ligera clorosis; c. las hojas superiores e inferiores se doblan pierden turgencia aunque conservan su color verde natural

Para este caso la escala de reacciones crecientes será por consiguiente un descriptor vindicador de proteínas, enzimas que pueden ocasionar detrimento en las células y moléculas, a consecuencia del estrés metalífero, inducido en estas pasturas.



Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 18. Síntomas de toxicidad por metales pesados en componentes vegetales aéreos y de suelo, 168 horas después del dopaje (7 días): 1 a. detalle en hoja testigo, b. planta entera, c. raíces.; 2. detalle en hoja dopada con Pb 500 ppm, b. planta entera, c. raíces; 3. detalle en hoja dopada con Cd 10 ppm, b. planta entera, c. raíces.; 4. detalle en hoja dopada con la mezcla de Cd 10 ppm x Pb 500 ppm, b. planta entera, c. raíces.

10 Evaluación del estrés abiótico en *Brachiaria spp.* Inducido por bioacumulación de
8 cadmio y plomo, en una zona aledaña al corredor petrolífero de Barrancabermeja (Colombia)

Cuadro 13. Estadios crecientes por toxicidad de metales pesados Cadmio y Plomo en *B. arrecta*, y situación de respuesta de la planta.

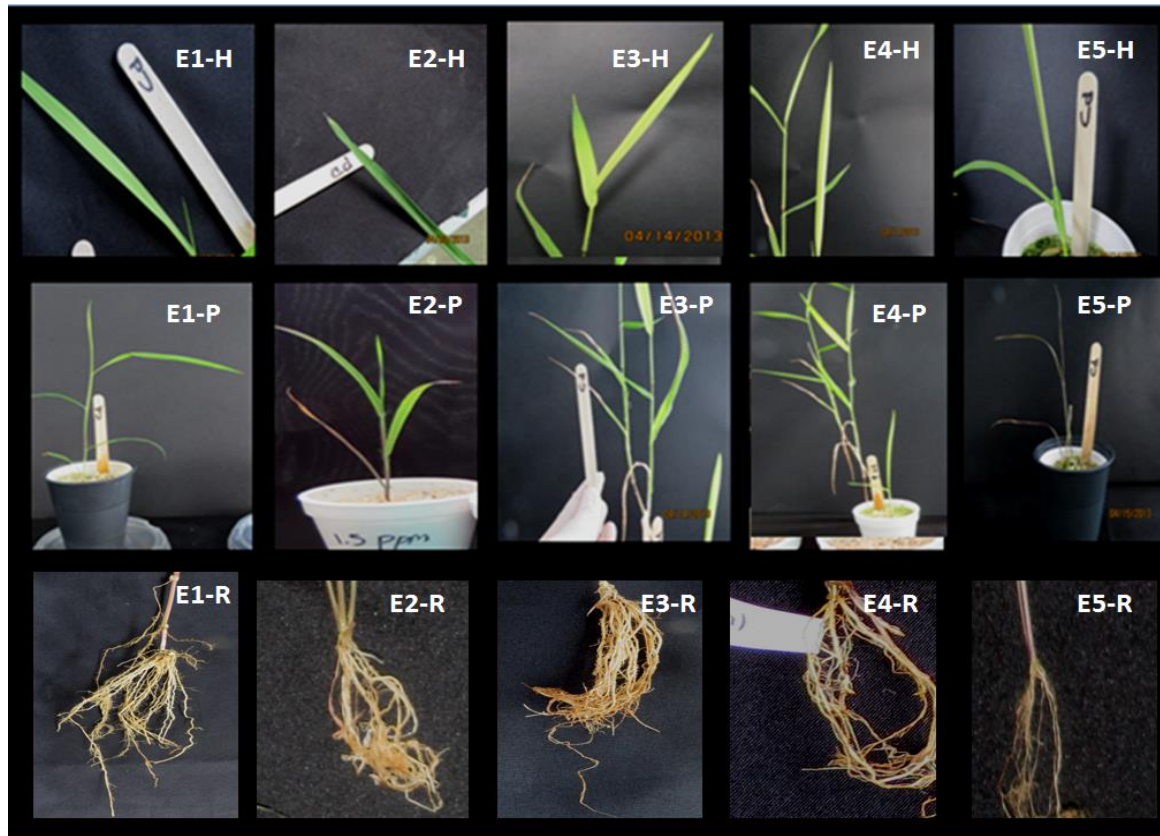
Estadio Tóxico metalífero	Denotación	Descripción Marcador de daño	Reacción de la Planta ante el metal pesado	Situación de respuesta de la planta
1	SD Sin daño	Sin daño (SD): El tejido se encuentra aparentemente sano, vigorosas y con coloración verdosa normal, sin deterioro en ambos limbos foliares, las raíces son abundantes y turgentes de color blanco o cremoso.	T Tolerante	Tolerante (T): La planta es tolerante ante la presencia del metal pesado en sus tejidos, aunque lo esté bioacumulando, posiblemente en las raíces o en las hojas y tallos (estructuras bajas). La planta crea barreras bioquímicas que secuestran el metal como: exudados radicales, mucilagos o fitosideróforos que quelatan naturalmente al metal tóxico evitando que se adsorba por las raíces.
2	DL Daño Leve	Daño leve (DL): Las hojas presentan ligeras necrosis o quemaduras en las puntas, no hay pérdida severa del color verde natural; las raíces son poco abundantes, color pardo entreverado por secciones, hay ligeros engrosamientos de las raíces primarias y secundaria. La planta puede recuperarse.	LT Ligeramente tolerante	Ligeramente Tolerante (LT): La planta puede llegar a tener contacto con el metal pesado, lo puede absorber, transportarlo y concentrarlo en sus tejidos, manifestar toxicidad de leve a muy leve, y rápidamente recuperarse ante el estrés del xenobiótico eliminándolo por exclusión.
3	DM Daño moderado	Daño moderado (DM): Las hojas pierden turgencia, puede presentarse una ligera clorosis en el primer tercio apical de las hojas. Entre un 25% y un 50% de las raíces pierden su funcionalidad, su color es pardo o rojizo muy intenso. La planta puede recuperarse.	MT Moderadamente tolerante	Moderadamente tolerante (MT): La planta tolera cierto grado de acumulación y daño visible, manifestando una apariencia de disturbio tóxico temporal. Los puntos de crecimiento vegetativo no se afectan, presentando recuperación durante el crecimiento ulterior a la intoxicación por el metal pesado. Sin embargo, la bioacumulación y la bioconcentración pueden llegar a ser alta, pero sin manifestación de daño total.
4	DS Daño severo	Daño severo (DS): Hay una clorosis generalizada en las hojas en más del 50% de su área foliar, algunas hojas presentan áreas necróticas pronunciadas, crecimiento retardado o abortado de hojas nuevas. A su vez, las hojas jóvenes aparecen enrolladas y las hojas maduras presentan forma de látigos. Las hojas en general presentan resequeidad y aspecto quebradizos o arrugadas. En algunas hojas pueden aparecer estrías o un cribado sobre las nervaduras. Las puntas aparecen necróticas o quemadas. Se puede presentar una necrosis prematura sobre las hojas bajas. Más del 50% de las raíces son disfuncionales, entre 25% y 50% de las raíces se necrosan, la coloración rojiza o marrón se intensifica.	S Susceptible	Susceptible (S): La planta es sensible ante la presencia del metal pesado, no es capaz de generar nuevo tejido asintomático, por lo tanto expresa grado variable de toxicidad como clorosis, cribados o rayados. Los tejidos nuevos pierden turgencia. Por la bioacumulación o bioconcentración, la planta transpira, y no realiza fotosíntesis, se detiene el crecimiento aéreo, las raíces se tornan marrones o rojizas, sufren deterioro marcado, pierden humedad.
5	DE Daño extremo	Daño extremo (DE): Ocurre la muerte parcial o total de la planta. Presentando pérdida de turgencia, seguida de necrosis seca en tejidos de hoja y de tallo, en algunos casos con doblado de hojas y muerte de la hoja bandera. Pérdida total de las raíces hasta un 100%. La planta definitivamente muere al perder su capacidad fotosintética y su sistema de transpiración y transporte de nutrientes.	MS Muy susceptible	Muy susceptible (MS): La planta es muy sensible ante la presencia del metal pesado, rápidamente lo adsorbe y absorbe, mostrando síntomas tempranos ante la acción tóxica. Hay pérdida temprana de raíces por disfuncionalidad, los tallos pierden turgencia, son frágiles y quebradizos, las hojas son cloróticas o necróticas en un porcentaje mayor a un 50%. Ocurre muerte de tejido aéreo y telúrico tempranamente el metal pesado.

Fuente: Peláez, M. 2013.



Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 19. Escala de estadios crecientes de síntomas tóxicos por Plomo en hojas, planta y raíces: (E1-H) Estadío 1 tóxico en hojas, (E1-P), Estadío 1 tóxico en planta, incluye el tallo, (E1-R) Estadío 1 tóxico en raíces.; (E2-H) Estadío 2 tóxico en hojas, (E2-P), Estadío 2 tóxico en planta, incluye el tallo, (E2-R) Estadío 2 tóxico en raíces.; (E3-H) Estadío 3 tóxico en hojas, (E3-P), Estadío 3 tóxico en planta, incluye el tallo, (E3-R) Estadío 3 tóxico en raíces.; (E4-H) Estadío 4 tóxico en hojas, (E4-P), Estadío 4 tóxico en planta, incluye el tallo, (E4-R) Estadío 2 tóxico en raíces.; (E5-H) Estadío 5 tóxico en hojas, (E5-P) Estadío 1 tóxico en planta, incluye el tallo, (E5-R) Estadío 1 tóxico en raíces.



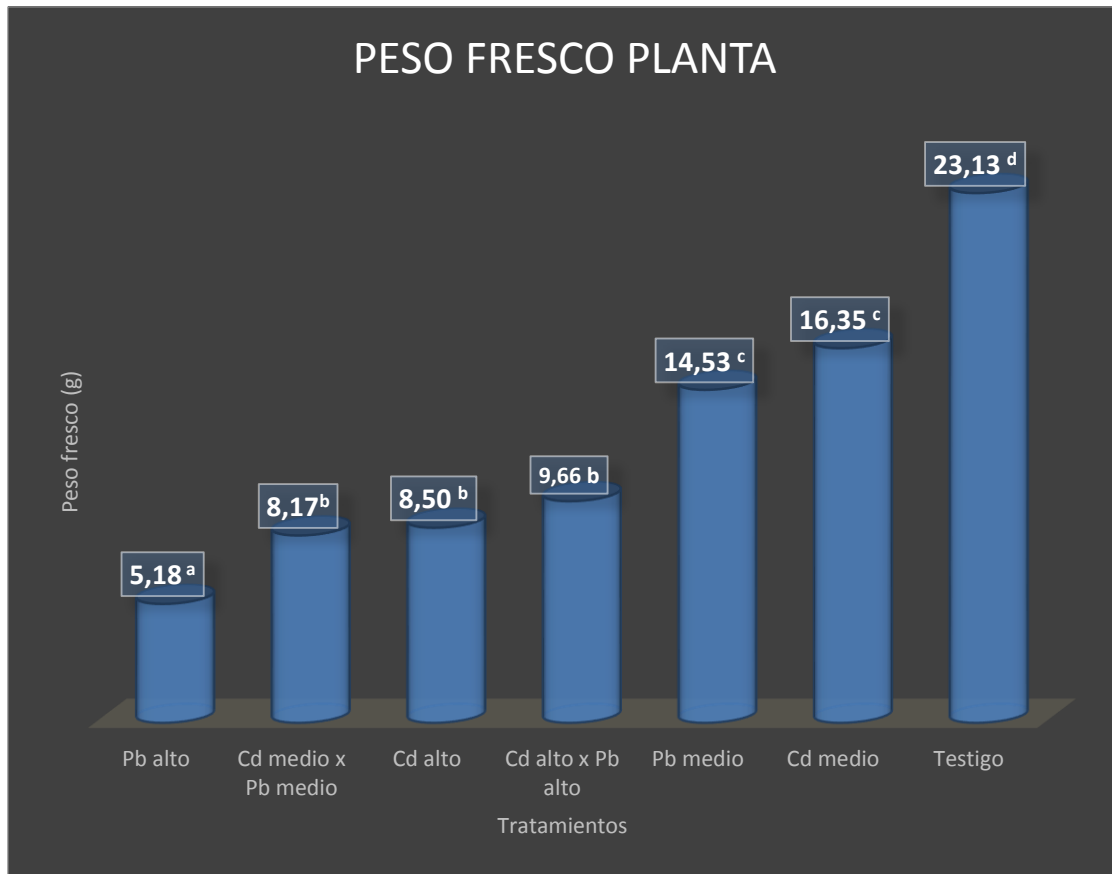
Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 20. Escala de estadios crecientes de síntomas tóxicos por cadmio en hojas, planta y raíces: (E1-H) Estadío 1 tóxico en hojas, (E1-P), Estadío 1 tóxico en planta, incluye el tallo, (E1-R) Estadío 1 tóxico en raíces.; (E2-H) Estadío 2 tóxico en hojas, (E2-P), Estadío 2 tóxico en planta, incluye el tallo, (E2-R) Estadío 2 tóxico en raíces.; (E3-H) Estadío 3 tóxico en hojas, (E3-P), Estadío 3 tóxico en planta, incluye el tallo, (E3-R) Estadío 3 tóxico en raíces.; (E4-H) Estadío 4 tóxico en hojas, (E4-P), Estadío 4 tóxico en planta, incluye el tallo, (E4-R) Estadío 2 tóxico en raíces.; (E5-H) Estadío 5 tóxico en hojas, (E5-P) Estadío 1 tóxico en planta, incluye el tallo, (E5-R) Estadío 1 tóxico en raíces.

- **Medición de variables morfofisiométricas.** Las observaciones morfofisiométricas de este estudio se reúne en los análisis de varianza y en las pruebas de medias de Bonfarroni que se encuentran en anexos (A y B), donde se evaluó el grado de estrés metalífero sobre los componentes aéreos (tallo y hojas) y sobre el componente telúrico (raíz).

En relación a las áreas foliares, pesos frescos y secos en plantas y raíces, longitud en planta y raíz, volumen y diámetro de las raíces, y potencial hídrico (presentadas en las figuras desde la 21 a la 30). Los resultados mostraron diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$) en todos los tratamientos en este caso los metales en donde al menos uno de ellos es diferente a los demás, no ocurre lo mismo en las repeticiones y en las plantas, excepto en algunas variables, como la repetición de peso seco planta ($p < 0.020$), el área foliar ($p < 0.0427$), el diámetro de la raíz ($p < 0.0006$) tampoco en la interacción repetición por planta. Anexo A.

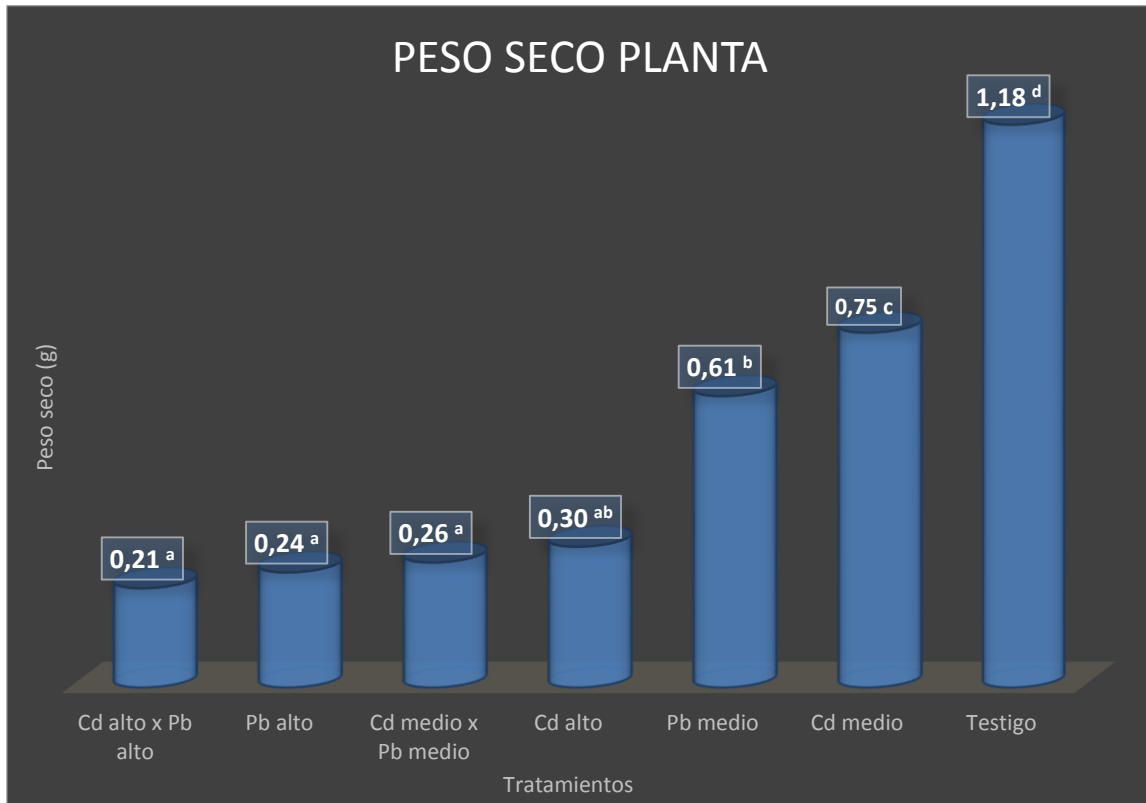
El Cadmio y Plomo, aplicados solos y en combinación sobre la solución nutritiva presentó efectos estresantes sobre la pastura *B. arrecta* para la variable peso fresco planta en comparación con el testigo (23.125 g), por lo que el análisis de varianza presento diferencia altamente significativa ($p < 0.0001$) (Anexo A y B.). En el caso de Pb alto (500 ppm) arrojó el peso más bajo (5.18 g) mostrando posiblemente detrimentos en la fisiología. A su vez, las combinaciones medias y altas de los metales redujeron el peso fresco comparado cuando se aplicaron solos (Figura 21). Autores como: (Rao *et al.*, 1993; Rao *et al.*, 1998; Rao *et al.*, 2004, Ricaurte 2006; García, 2006 y Casierra 2009), afirman que en condiciones de estrés alumínico y bajo Fósforo puede afectarse en menor proporción el crecimiento radical en relación al crecimiento del follaje, debido a que la planta invierte más energía en el desarrollo y afianzamiento de las raíces.



Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 21. Gráfico de medias de Bonferroni para la variable peso fresco planta, en relación a los tratamientos: Cadmio medio (1.5 ppm) y Cadmio alto (10 ppm); Plomo medio (150 ppm) y Plomo alto (500 ppm); y combinaciones concentraciones medias de Cd medio x Pb medio (Cd 1.5 ppm x Pb 150 ppm) y concentraciones altas (Cd 10 ppm x Pb 500 ppm) y el testigo (blanco). Letras diferentes indican que hay diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$)

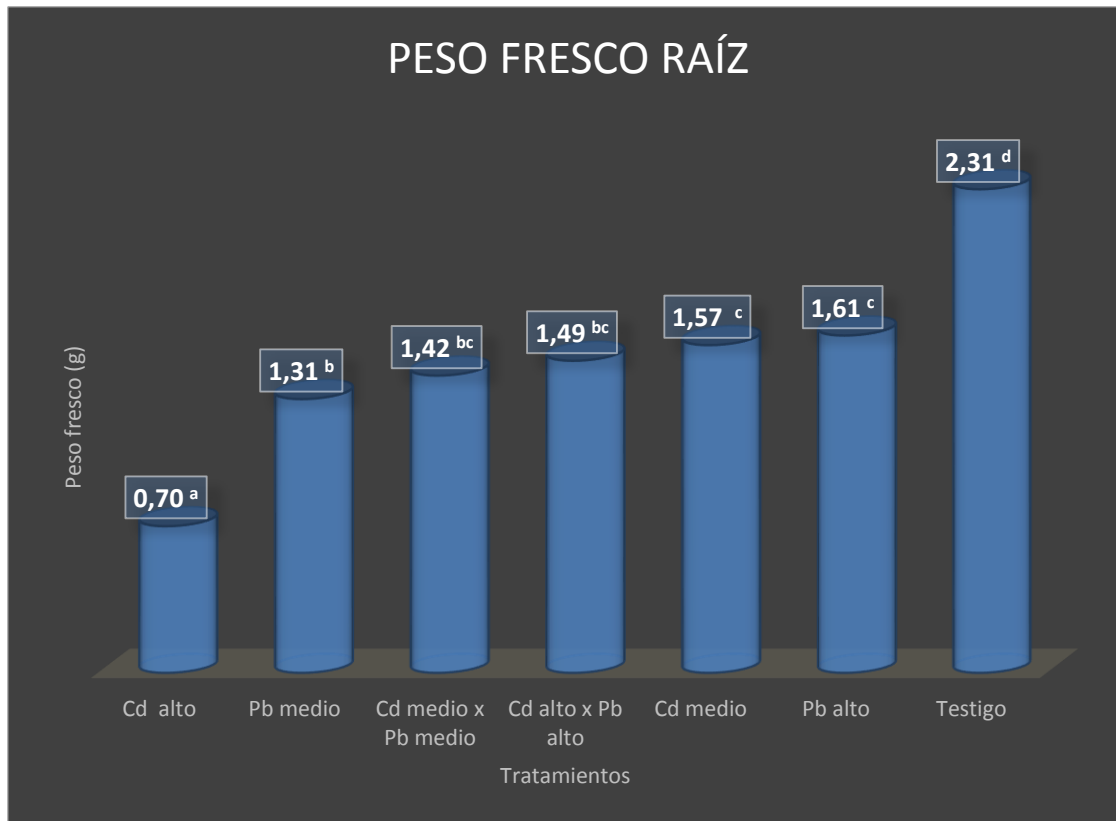
Se presentó efecto significativo en todos los tratamientos con dopaje de Cd y Pb sobre la pastura *B. arrecta*, en relación a variable peso seco planta comparada con el testigo (1.18 g), siendo las concentraciones altas por metal Cd alto (0.30 g) y en combinación Cd alto x Pb alto (0.21g) las que presentaron los valores más bajos, en relaciones a sus concentraciones medias que fueron para Cd (0.74 g) (Figura 22).



Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 22. Gráfico de medias de Bonferroni para la variable peso seco planta, en relación a los tratamientos: Cadmio medio (1.5 ppm) y Cadmio alto (10 ppm); Plomo medio (150 ppm) y Plomo alto (500 ppm); y combinaciones concentraciones medias de Cd medio x Pb medio (Cd 1.5 ppm x Pb 150 ppm) y concentraciones altas (Cd 10 ppm x Pb 500 ppm) y el testigo (blanco). Letras diferentes indican que hay diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$)

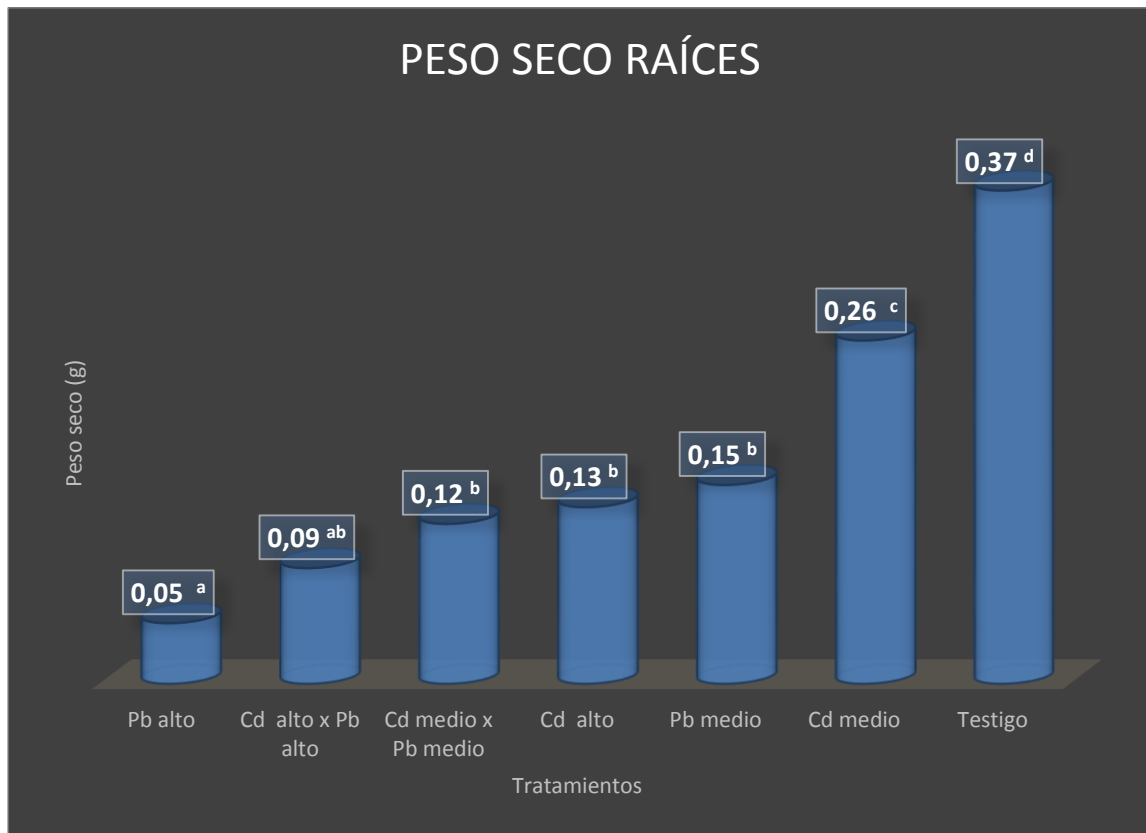
Observaciones realizadas por Mejía (2007), en dos especies de *Brachiaria* (*decumbens* y *ruzizensis*), encontró que hay relaciones entre la absorción total de Fósforo y un mayor peso seco de biomasa aérea. En este estudio se presentó poca absorción de estos iones, al estresar las plantas con las sales metalíferas.



Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 23. Gráfico de medias de Bonferroni para la variable peso fresco raíz, en relación a los tratamientos: Cadmio medio (1.5 ppm) y Cadmio alto (10 ppm); Plomo medio (150 ppm) y Plomo alto (500 ppm); y combinaciones concentraciones medias de Cd medio x Pb medio (Cd 1.5 ppm x Pb 150 ppm) y concentraciones altas (Cd 10 ppm x Pb 500 ppm) y el testigo (blanco). Letras diferentes indican que hay diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$)

Las diferencias en las medias fueron significativas al dopaje con las sales metalíferas, comparadas con el testigo para la variable peso fresco raíz (2,31 g). Hay reducción drástica en el valor del peso fresco de la raíz en el tratamiento con Cd alto (0.70 g). El comportamiento del resto expresado en valores está próximo a una media general por lo que no dice mucho de la utilidad de esta variable, y solo debe tomarse solo para la construcción de porcentaje de materia seca (Figura 23).



Fuente: Peláez, M. 2013.

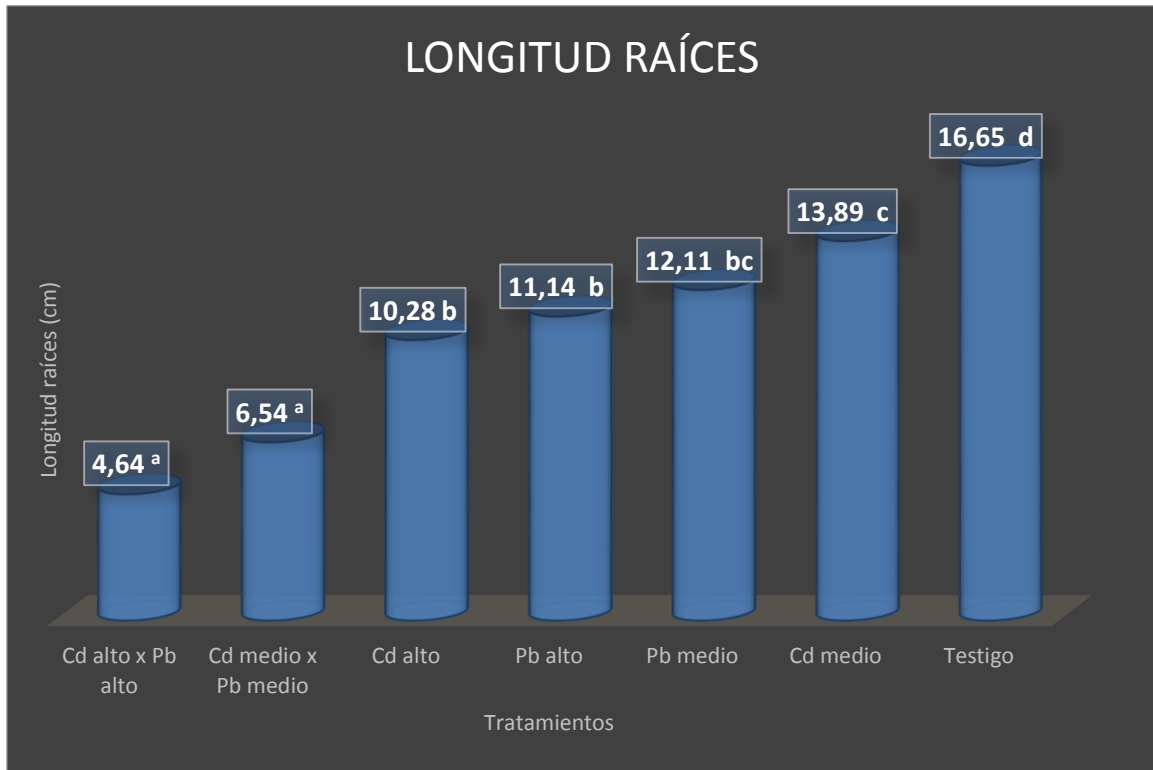
Figura 24. Gráfico de medias de Bonferroni para la variable peso seco raíces, en relación a los tratamientos: Cadmio medio (1.5 ppm) y Cadmio alto (10 ppm); Plomo medio (150 ppm) y Plomo alto (500 ppm); y combinaciones concentraciones medias de Cd medio x Pb medio (Cd 1.5 ppm x Pb 150 ppm) y concentraciones altas (Cd 10 ppm x Pb 500 ppm) y el testigo (blanco). Letras diferentes indican que hay diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$)

El peso seco de raíces en el experimento presentó diferencias en las medias para la prueba de Bonferroni, comparadas con el testigo (0,37 g), seguida de Cd bajo (0,26 g). A su vez los valores más bajos se encontraron en esta variable en los tratamientos combinados tanto en concentraciones medias y altas (0.12 y 0,09 g) respectivamente. El Plomo alto registró el peso más bajo con (0.05 g) (Figura 24). Casierra y Aguilar (2007), mencionan que para el caso del estrés por aluminio ocurre una inhibición del crecimiento en las raíces, seguido de engrosamiento de las mismas (Ricaurte, 2006 y Casierra y Aguilar 2007), sugiriendo que en estas fisiopatías el citoesqueleto es el blanco del tóxico. Aspecto este que se analizara en el capítulo sobre los daños ultraestructurales en la célula.

Las combinaciones de tanto medias como altas de Cd y Pb, mostraron para la variable longitud de raíces efectos drásticos en cuanto al desarrollo de crecimiento longitudinal de las raíces (Figura 25). Por su parte los tratamientos que incluían solo los metales por separado presento medias homogéneas en relación a la expresión de esta variable, por lo que podría explicarse en que estos metales ejercen menor bioconcentración y las plantas podría recurrir a situaciones de exclusión de estos metales cuando son absorbidos por separado en las raíces. Una posible explicación es el bloqueo o agotamiento de elementos como K y P, estos elementos pueden moverse a favor de gradientes hacia la raíz, en flujos de masa. Los metales pesados pueden ocupar estos espacios y propiciar el estrés generando bajos niveles de P afectando la longitud radical total, peso radical y extensibilidad expresada esta última como masa o área superficial (Mejía, 2007).

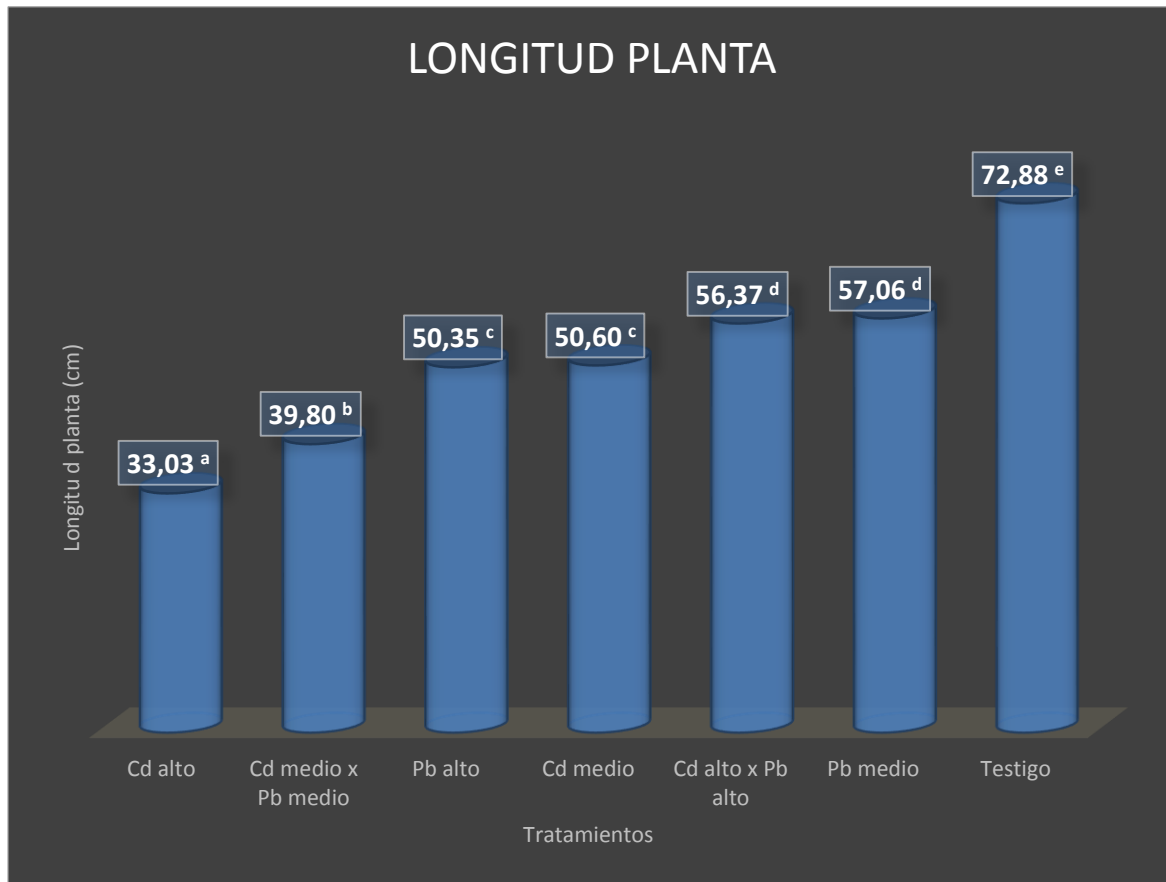
El desarrollo de la raíz en volumen y longitud, siempre será un factor determinante sobre las tasas de absorción de agua por las plantas, afectado por consiguiente la fisiología normal de la planta en aspectos fisiológicos como la fotosíntesis, la respiración, la elongación celular y el metabolismo, entre otros, Kramer (1983).

Los tratamientos con Cd en concentración alta y la mezcla de Cd por Pb en concentración media tuvieron un detrimento en la variable morfométrica longitud de la planta (33,05 y 39,8 cm), con relación a los otros dopajes y el blanco. Esta variable puede ser indicadora de estrés metalífero en donde el catión Cd^{2+} puede impedir la absorción de otros minerales que si son esenciales para las funciones metabólicas de la planta. La longitud total media de raíces siguió una tendencia similar al comportamiento general (Figura 26). En este orden al crecer la planta y absorber los nutrientes, la concentración de éstos alrededor de la raíz va decreciendo, como es el caso del K y del P y su concentración agotándose de la solución hidropónica y de los lugares de intercambio iónico (Rao *et al.*, 1998), estos investigadores mencionan que la longitud específica de raíces, puede ser un parámetro indicador que diferencie raíces más finas por la formación de valores más altos generados con la relación de la longitud de raíces dividido sobre su peso.



Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 25. Gráfico de medias de Bonferroni para la variable longitud de raíces, en relación a los tratamientos: Cadmio medio (1.5 ppm) y Cadmio alto (10 ppm); Plomo medio (150 ppm) y Plomo alto (500 ppm); y combinaciones concentraciones medias de Cd medio x Pb medio (Cd 1.5 ppm x Pb 150 ppm) y concentraciones altas (Cd 10 ppm x Pb 500 ppm) y el testigo (blanco). Letras diferentes indican que hay diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$)



Fuente: Peláez, M. 2013.

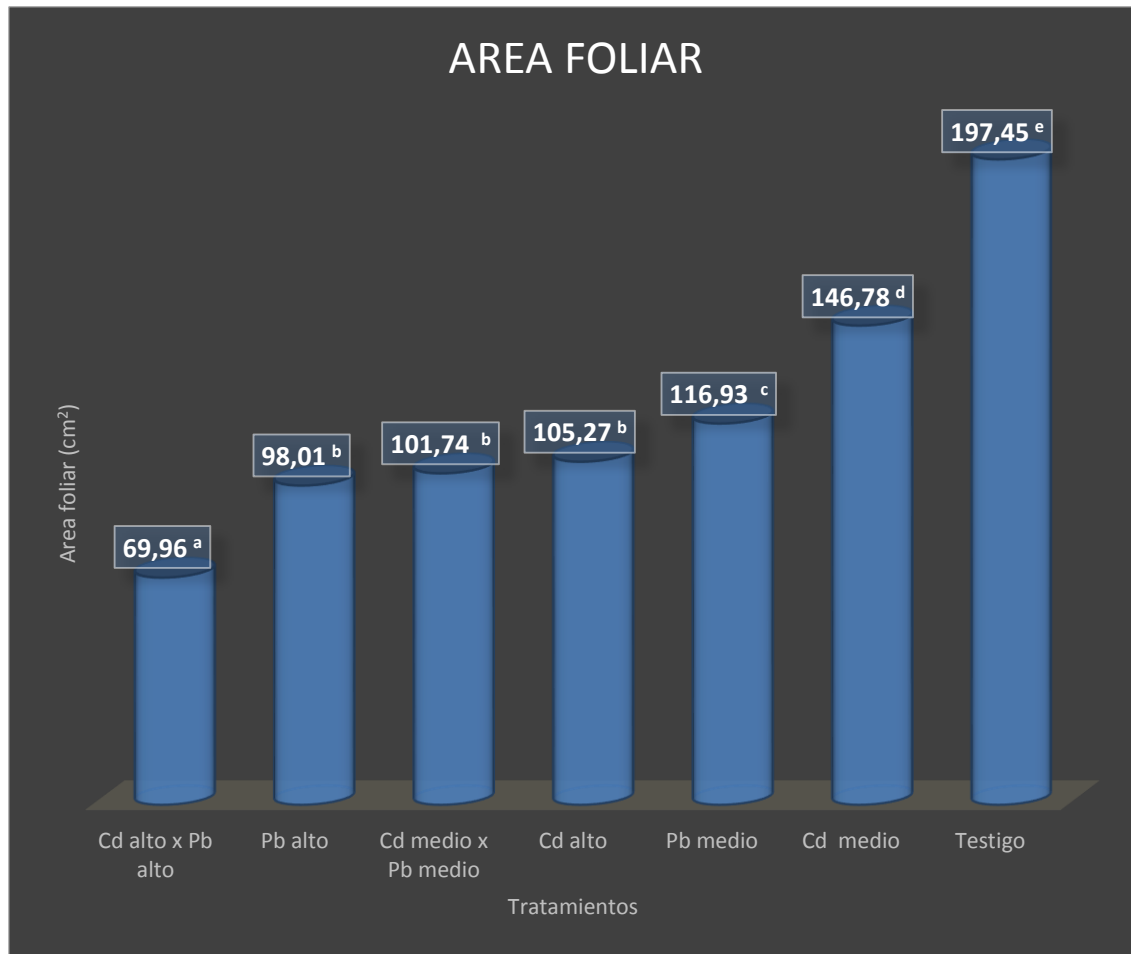
Figura 26. Gráfico de medias de Bonferroni para la variable longitud total planta, en relación a los tratamientos: Cadmio medio (1.5 ppm) y Cadmio alto (10 ppm); Plomo medio (150 ppm) y Plomo alto (500 ppm); y combinaciones concentraciones medias de Cd medio x Pb medio (Cd 1.5 ppm x Pb 150 ppm) y concentraciones altas (Cd 10 ppm x Pb 500 ppm) y el testigo (blanco). Letras diferentes indican que hay diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$)

Autores como Vitorello *et al.*, (2005), mencionan que una consecuencia a estos desbalances nutricionales, es una cadena acelerada de cambios ultraestructurales en las células de las hojas, reducción en la apertura de estomas, reducción en la tasa de fotosíntesis, clorosis generalizada, aumento de superficies necróticas en las hojas y baja biomasa área.

Las mediciones sobre el área foliar mostradas en la (Figura 27), permitieron hacer una discriminación sobre el efecto marcado de los metales en combinación en la expresión de esta variable integradora de procesos como la nutrición y fotosíntesis. Todos los tratamientos mostraron grandes diferencias en relación al testigo. Esto es explicable por lo que las plantas expuestas requieren unos elementos esenciales inorgánicos en concentraciones adecuadas, como C, H, O, N, P, S, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, Cl. Todos estos elementos que son esenciales para que la planta pueda completar su ciclo biológico, no pueden ser sustituidos por elementos no funcionales como los metales tóxicos Cd y el Pb.

El diámetro de las raíces (Figura 28), fue mayor en el testigo en relación a los demás tratamientos. Sin embargo en las plantas expuestas a contenidos altos de Plomo, mostraron mayor grosor esto puede explicarse con base a que éstas plantas en sus entornos naturales han evolucionado con diferentes estreses abióticos, tanto nutricionales como de sequía e inundación y por lo tanto han optado por aumentar o disminuir el volumen y diámetros en sus raíces como estrategia de sobrevivencia o adaptación, en situaciones pueden engrosan su sistema radical buscando ahorrar energía en la conversión de fotosíntatos o azúcares o glúcidos, producto de sus metabolismo primario, en contravía la planta al no demandar mayores recursos nutritivos puede optar por adelgazar las raíces con el fin de alcanzar mayores profundidades en busca de elementos nutritivos y de oxígeno para ser más eficiente en la conversión de fotosíntatos o de sacarosa (Ricaurte, 2006).

Las combinaciones de los metales pesados Cd x Pb en concentraciones medias y altas presentaron un menor volumen de raíces en relación a los tratamientos donde se encontraron solos (Figura 29), lo anterior sugiere que puede existir sinergismo entre estos dos cationes en detrimento del crecimiento de las raíces



Fuente: Peláez, M. 2013.

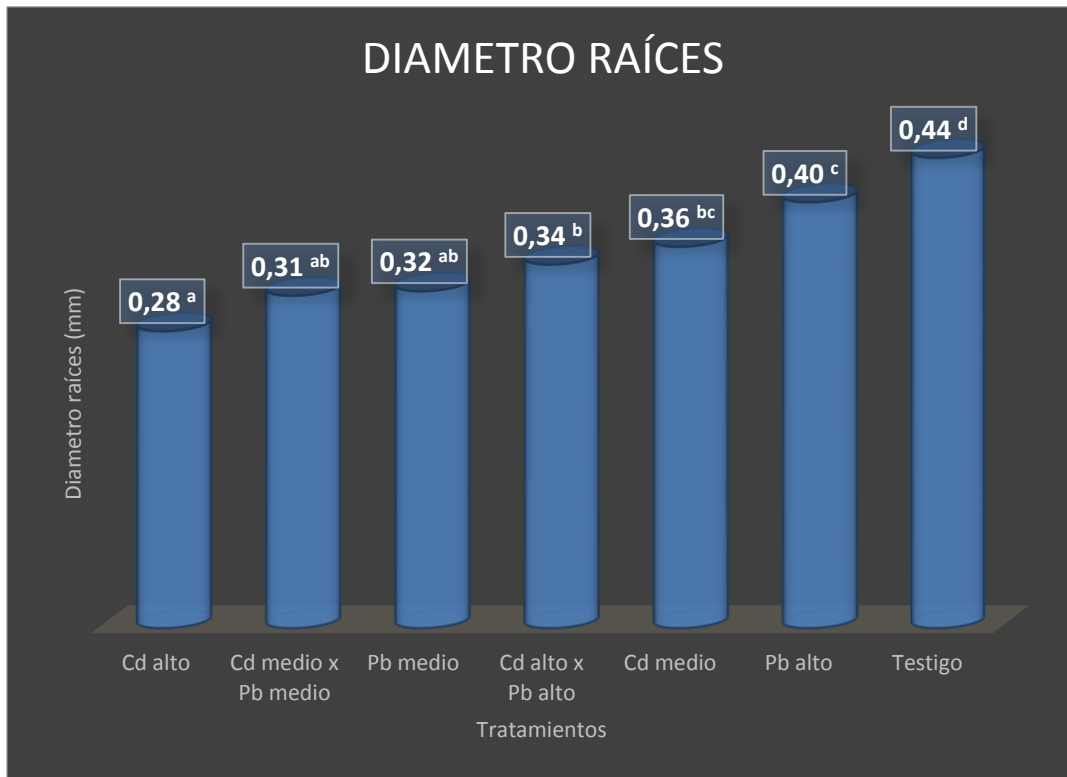
Figura 27. Gráfico de medias de Bonferroni para la variable área foliar, en relación a los tratamientos: Cadmio medio (1.5 ppm) y Cadmio alto (10 ppm); Plomo medio (150 ppm) y Plomo alto (500 ppm); y combinaciones concentraciones medias de Cd medio x Pb medio (Cd 1.5 ppm x Pb 150 ppm) y concentraciones altas (Cd 10 ppm x Pb 500 ppm) y el testigo (blanco). Letras diferentes indican que hay diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$)

Estos datos sugieren que esta variable puede ser indicativa de que se presente bioacumulación metalífera en las raíces de estas poáceas. Si se observa que las cargas positivas de los cationes interfieren la entrada de elementos como el Calcio, Zinc y Fósforo, al ocurrir estos desbalances nutricionales, aunque las plantas estén en condiciones óptimas de nutrición desarrollaron menos raíces en relación al testigo o los tratamientos

con concentraciones medias o altas donde apareció solo un metal (Figura 29). La información contenida en esta variable no permite valorar el impacto del estrés metalífero sobre las raíces si se considera el rango tan estrecho de estas mediciones. Comparando los tratamientos con concentraciones altas y medias de Cd y Pb en raíces con la relación a la variables longitud total (relación directa de componentes aéreos/componentes telúricos) se observó un efecto de saturación en las raíces que no se refleja en un efecto igual en los componentes aéreos. Esto apunta a que en las relaciones patógeno abiótico-planta como Pb-Cd raíz / Pb-Cd parte aérea, Pb raíz / Pb componente aéreo y Cd raíz / Cd componente aéreo, es el elevado nivel de transferencia en todo los casos (relaciones de bioconcentración compartimental) (Ruíz y Hernández, 2012). En los componentes aéreos, se mantiene un flujo continuo de bioacumulandos de los metalíferos tóxicos proporcionalmente al tiempo de exposición al xenobiótico (García, 2006). Lo anterior explica que el flujo permanente de translocación del Pb y Cd entre la raíz y la parte aérea posiblemente se deba al daño ocasionado tanto en tejidos y células de la raíz, por lo que ofrece entonces poca resistencia, como producto del estrés oxidativo (Rodríguez *et al.*, 2008).

En los tratamientos en donde se involucró las sales de CdCl_2 , expresaron un menor diámetro de la raíces, sobre todo en la concentración alta (0,27 mM) (Figura 28). Elevadas concentraciones en estos metales, generan un estrés que baja la presión hídrica en relación a las plantas testigo (con valores menos negativos). Las concentraciones probadas posiblemente aumentaron la rigidez de las membranas celulares, o quizás determinaron grados de viscosidad del agua dificultando la absorción de nutrientes.

En este trabajo, solo se trató material expuesto a diferentes concentraciones, mostrando que las bajas presiones hídricas son consecuencia de una fuerte descompensación entre las hojas y el sistema radical por la adición de sales metalíferas al agua que disminuye su potencial hídrico haciéndolo más negativo (Figura 30). García (2006), encontró en plantas de maíz, expuestas a la acción toxica de Plomo diferencias significativas en los tratamientos que contenía Pb+EDTA, en relación a tratamientos que no contenían el agente quelatante, donde los valores de potencial hídrico ($\psi_{\text{H}_2\text{O}}$) de la parte aérea fueron más bajos que en la raíces.

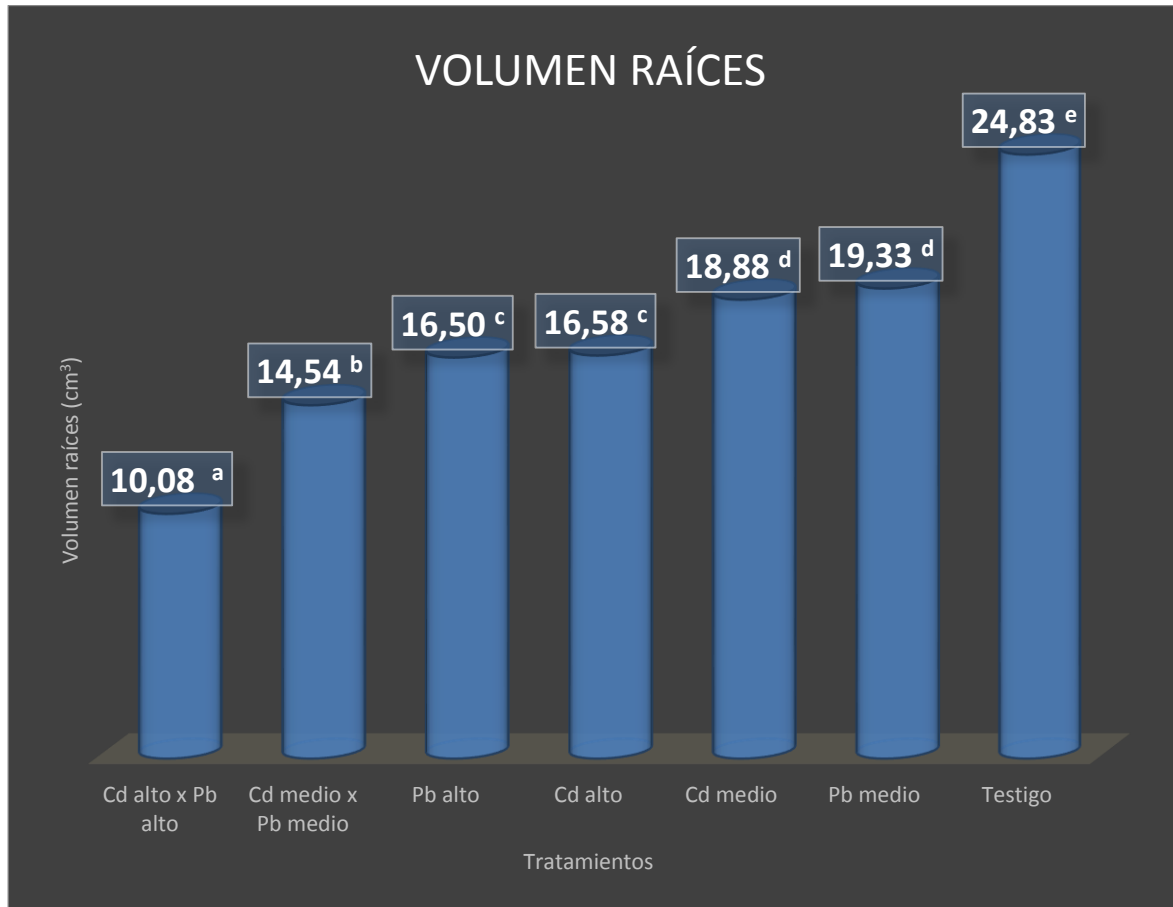


Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 28. Gráfico de medias Bonferroni para la variable diámetro de raíces, en relación a los tratamientos: Cadmio medio (1.5 ppm) y Cadmio alto (10 ppm); Plomo medio (150 ppm) y Plomo alto (500 ppm); y combinaciones concentraciones medias de Cd medio x Pb medio (Cd 1.5 ppm x Pb 150 ppm) y concentraciones altas (Cd 10 ppm x Pb 500 ppm) y el testigo (blanco). Letras diferentes indican que hay diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$)

Los resultados de esta tesis coincide por lo argumentado por García en (2006) y Gunsé *et al.*, (1997), en el sentido de que algunos metales pesados pueden ocasionar reducción de la elasticidad y de la extensibilidad de las paredes celulares. Salisbury y Ross (1994), explican que las sustancias que penetran en las células vegetales deben estar disueltas, por lo que en las soluciones se efectúa el intercambio entre células, órganos y tejidos. Taiz y Zeiger en el (2009) mencionan que el agua como componente del citoplasma vivo, participa en el metabolismo y en todos los procesos bioquímicos (Lamoreaux *et al.*, 1978). Para este estudio el estrés severo inducido por las sales $Pb(NO_3)_2$ y $CdCl_2$ hacia *B. arrecta*

mostraron una pérdida de turgencia, marchitamiento y una disminución del alargamiento celular, asociado posiblemente con cierre de estomas, lo que reduce los procesos fotosintéticos y la respiración, interfiriendo en varios procesos metabólicos básicos (Gunsé *et al.*, 1997, Seregin e Ivaniov, 2001). Esto explica la deshidratación permanente de los tejidos que ocasiona la desorganización del protoplasma y la muerte de muchas células, como se apreció en las observaciones tisulares y celulares, discutidas en este capítulo.



Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 29. Gráfico de medias de Bonferroni para la variable volumen de raíces, en relación a los tratamientos: Cadmio medio (1.5 ppm) y Cadmio alto (10 ppm); Plomo medio (150 ppm) y Plomo alto (500 ppm); y combinaciones concentraciones medias de Cd medio x Pb medio (Cd 1.5 ppm x Pb 150 ppm) y concentraciones altas (Cd 10 ppm x Pb 500 ppm) y el testigo (blanco). Letras diferentes indican que hay diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$)

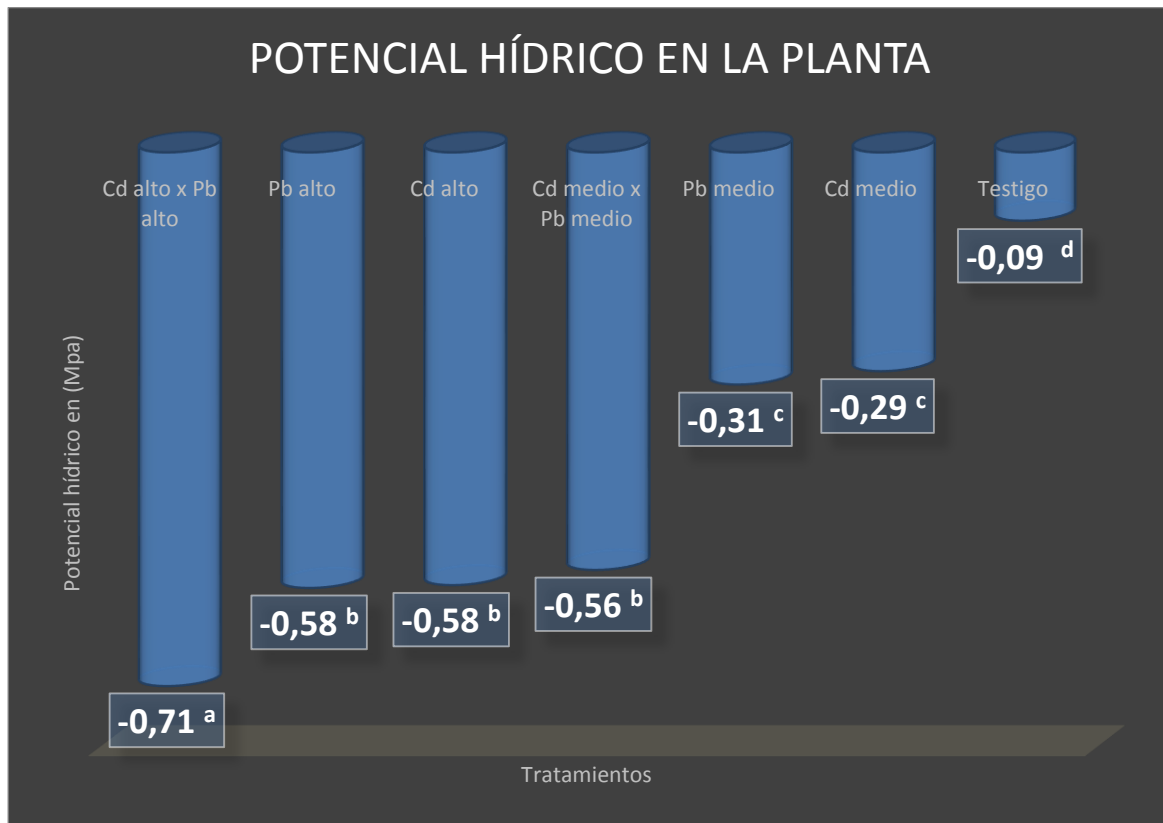
Los resultados obtenidos en estas mediciones confirman los efectos deletéreos de los metales pesados sobre los tejidos vegetales en este caso la pastura *Brachiaria arrecta*. Se apreció como el metal la sal $Pb(NO_3)_2$ tanto a concentración de 150 ppm y 500 ppm, solas o en sus combinaciones con medias y altas con el $CdCl_2$ a (1,5 y 10 ppm respectivamente), reducen el crecimiento en longitud de la planta y su raíz, presentado síntomas que en principio pueden confundirse con deficiencias de nutrientes esenciales, pero que con el diseño de la escala de reacciones crecientes, estos síntomas evolucionan hacia diferentes cuadros, que al final, son la integración de varios disturbios desde simples clorosis, necrosis, y de una muerte celular programada, este último término acuñado por Danon y Gallois (1998). Predomina en las intoxicaciones con Plomo el daño en raíces, afectando la longitud, diámetro y volumen, mostrando un cambio en los colores habituales de blanco-cremoso a un marrón o rojo intenso, como una señal a los daños internos que pueda afrontar este tejido al alterarse el transporte de nutrientes como P, K y Ca. Es importante anotar como los tratamientos que contenían Plomo influyeron en la distribución total de los elementos nutritivos dentro de los diferentes órganos de la planta. En la distribución total de Manganeso y Azufre cambió a favor de la raíz por encima de la parte aérea bajo condiciones de toxicidad con Plomo en concentraciones medias o altas o combinadas con Cadmio. Esta retención de los iones metálicos tóxicos retenidos en las raíces desbalancearon los contenidos óptimos de elementos como el Fósforo, el Magnesio o el Zinc. Paivoke en el (2002) encontró en *Pisum sativum* correlaciones negativas con el contenido de Plomo en el suelo, y también detectó que la actividad fosfatasa es afectada por el contenido de plomo. Por su parte en la relación con el nitrógeno, sucede que el contenido de este elemento en la raíz es drásticamente reducido aún en bajas concentraciones del tóxico Pb^{2+} . La absorción de nitrato disminuye en las plantas de pepino expuestas a plomo con una concomitante el descenso de la actividad de la enzima nitrato reductasa NR, con lo cual es afectado el metabolismo del nitrógeno. El descenso de la absorción de nitrato debido al Plomo puede ser la resultante del estrés hídrico creado por el Plomo, como se evidencio en los bajos potenciales hídricos encontrados aquí (Figura 30). Paivoke en el (2002), relacionó que un incremento en el contenido de nitrógeno de raíces de *Pisum sativum* bajo tratamiento con Plomo a una concentración de 2 mmol kg^{-1} de suelo, produjo efectos inhibitorios del Plomo sobre la actividad de la enzima nitrato reductasa.

Fue notorio los cambios en peso fresco y peso seco que experimento la raíz en todos los tratamientos especialmente con Plomo, con relación al testigo (Figuras 23 y 24), donde las raíces primarias en todos los casos resultaron más alterada en la variable longitud, estas observaciones indican que el Plomo se bioacumula en los puntos de crecimiento activo de las raíces más fácilmente que en los tejidos menos jóvenes, esto se manifiesta en las mediciones de peso seco y en el porcentaje total de materia seca el cual con el tiempo incrementa el daño fitotóxico. García (2006), explica que cuando disminuye la absorción de elementos menores y mayores en masa se debe posiblemente a un estrés por Plomo con el consiguiente desorden nutricional inducidos por el tóxico en el metabolismo celular, causando cambios en las actividades enzimáticas de la membrana y en el citoesqueleto (Casierra, 2004). Así, cuando ocurre un eflujo de K^+ desde las raíces, por una extrema sensibilidad de la ATPasa y de los grupos SH de las proteínas de la membrana celular hacia el Plomo (García, 2006).

Los tratamientos que contenían altas concentraciones de Plomo y Cadmio solos o en combinación presentaron los potenciales hídricos más bajos en relación al testigo, esto se explica con base a que probablemente se asocie una disminución en la tasa de transpiración y en el contenido hídrico de los tejidos en estas plantas estresadas con los metales Plomo y Cadmio.

García (2006), menciona para el caso del ion Pb^{2+} este metal induce una cascada de efectos retardantes en el crecimiento dando como resultado una reducida área foliar, y por consiguiente una desventaja para los órganos con mayor transpiración en las plantas, las hojas. En *Zea mays* las células de guarda generalmente presentan un tamaño menor al ser tratadas con Plomo, debido a que éste metal provoca descenso en los niveles de componentes que están asociados con el mantenimiento de la turgencia celular y de la plasticidad de la pared celular (García, 2006). Así, se explica entonces como ocurre una baja en el potencial hídrico dentro de la célula (Bazzaz *et al.*, 1974). Puede que presentarse que ciertos iones metálicos incrementen el contenido en ABA e induzcan el cierre estomático (Casierra y Aguilar 2007). Otro mecanismo posible es que ocurra un desorden en la respiración y en la fosforilación oxidativa cuando las plantas están bajo la acción toxica de la sal metálica $CdCl_2$ o $Pb(NO_3)_2$ causando desajuste en el potencial hídrico. Se ha demostrado en bioensayos con fragmentos de epidermis flotando en solución con Plomo como este metal induce el cierre de estomas (Bazzaz *et al.*, 1974). En

hojas separadas de maíz y soja se ha demostrado como el Plomo y otros metales incrementan la resistencia estomática no únicamente cuando se aplican directamente a células guarda o células epidérmicas sino también cuando éstos alcanzan los conductos del xilema, debido posiblemente a la inhibición de un sistema de energía o alteraciones de flujos de K^+ a través de las membranas (Bazzaz *et al.*, 1974).



Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 30. Gráfico de medias Bonferroni para la variable potencial hídrico, en relación a los tratamientos: Cadmio medio (1.5 ppm) y Cadmio alto (10 ppm); Plomo medio (150 ppm) y Plomo alto (500 ppm); y combinaciones concentraciones medias de Cd medio x Pb medio (Cd 1.5 ppm x Pb 150 ppm) y concentraciones altas (Cd 10 ppm x Pb 500 ppm) y el testigo (blanco). Letras diferentes indican que hay diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$)

Los resultados hasta aquí presentados en esta tesis sobre las fisiopatías causadas por Cd^{2+} y Pb^{2+} , nos debe llevar a plantear de que estos metales tóxicos se bioacumulan mayormente en las raíces, en sus puntos de crecimiento especialmente para el Plomo, estas observaciones se apoyan en otros resultados como los obtenidos por Kosobrukhov (2004) quien observo disminución en las síntesis de polisacáridos en las raíces en plantas de *Plantago mayor* una vez que la expuso al Plomo.

García (2006) en plantas de *Zea mays* encontró una disminución en la longitud y diámetros de las raíces cuando sometieron a éstas plantas a concentraciones bajas y medias de Plomo. Sin embargo, estos autores no siempre encontraron asociados reducción en crecimiento radical con disminución del peso seco, como si se encontraron en presente estudio. Ahora, hay coincidencias de que, posiblemente ocurra una inhibición de la división celular en los sitios de crecimiento, como lo afirman Eun *et al.*, (2000). Zhang *et al.*, (2006) relacionaron que en un suelo contaminado con Pb a una concentración de $388 \pm 23 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ produjeron que la raíz de *Vicia faba* absorberá una mayor cantidad de Pb 273.1 ± 2 y el tallo $3.3 \pm 1.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, resultados coincidentes a los hallados en esta investigación.

Hedaya en el (2008) reportó resultados contradictorios a los aquí presentados para plantas de haba que crecieron en una solución nutritiva con 48 mM Pb, este investigador obtuvo un incremento de su peso seco con respecto al blanco. Estos resultados obtenidos por este investigador deben considerar la poca o nula funcionalidad del Pb^{2+} para el crecimiento de una especie vegetal. García *et al.*, (2011), mencionan que puede haber efectos estimulantes de algunas sales de Pb como el $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a bajas concentraciones sobre el crecimiento de plantas. Tessier *et al.*, (1996), en diferentes ensayos concluyen que a una concentración de Pb igual a $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ aparece una ligera disminución en el crecimiento de las raíces de cebada; y que a una concentración igual a $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ se causaba una reducción severa, a su vez, ante concentraciones alrededor de $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ el crecimiento radical es fuertemente afectado. Sin embargo, los tallos resultan más resistentes y que a una concentración de $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ el crecimiento no es suprimido.

En las fisiopatías aéreas, tal vez se encuentre mayormente involucrado el Cadmio, debido a que este metal se encuentra más a menudo combinado con otros elementos (tales como oxígeno, cloro o azufre) formando compuestos (Pielichowska y Wierzbicka, 2004). El Cadmio entra en la vía apoplasto o simplasto por absorción en las raíces y de ahí llega por

movilidad media a los tallos y hojas. Aunque en este estudio, no se aplicó el Cadmio o el Plomo de manera foliar, se sabe que el Cd entra a las plantas por las raíces. Usualmente, es absorbido por las raicillas y posteriormente puede ocasionar el desplazamiento de otros elementos como el Ca, Mg, P y K o microelementos como el Zn o Fe (Benavides, 2005), desencadenando clorosis generalizadas, interrumpiendo por consiguiente la síntesis de clorofila como se apreció en la descripción de síntomas en la especie *B. arrecta* y los niveles tan bajos encontrados en los análisis foliares en este estudio.

Trabajos de García *et al.*, en el 2011, llegaron a conclusiones similares a las aquí encontradas, para las plantas de haba y avena a los 60 días de crecimiento especificando que el Pb^{2+} se bioconcentra y se bioacumula en las raíces más que la parte aérea. También Wu *et al.* (2005) reportó resultados similares a los anteriores de que hay mayor bioacumulación de Pb^{2+} en la raíz de *Vicia cracca*. Otros investigadores, como: Malkowski *et al.*, 2002 y García, 2006, concuerdan con lo reportado en el presente estudio, en el sentido de que estos investigadores relacionaron concentración de Pb en las raíces de plántulas de maíz con incrementos en las concentraciones de Pb en la solución. Hedaya (2008) encontró concentraciones mayores de Pb en raíces que en hojas de haba. (Wozny *et al.*, 1995), encontraron que las raíces pueden acumular de 3 a 50 veces más Pb en relación a las hojas.

Los síntomas foliares por toxicidad de Cd^{2+} apreciadas en la escala de reacciones crecientes de daños por éste el estrés en la especie *B. arrecta*, pueden variar dependiendo de la edad de la hoja, siendo esta evolución creciente desde colores amarillos claros o pálidos en la hoja bandera hasta coalescer totalmente y aparecer con el tiempo mucho más y acentuado la pérdida de clorofila en estas hojas y en los brotes.

Cuando la intoxicación es extrema aparecen quemazones o necrosis en tejidos (Figura 18, EH3-Eh5), estos síntomas posiblemente establezcan similitudes a los ocasionados por deficiencias de N y de Fe, en donde el Cadmio precipite a estos nutrientes en sus formas labiales NO_2 y Fe^{2+} y se cree por consiguiente una deficiencia en el medio, como ocurrió en este estudio. En cambio en las toxicidades por Plomo los síntomas aéreos o foliares más característicos fueron los rayados, apareciendo en los espacios intervenales

coloraciones amarillas tenues o acentuadas según el tiempo a que estuvieron expuestas, conservando en los nervaduras más finas ligeros colores verdes pálidos, y mayor acentuación del color verde en los nervaduras más gruesos al iniciar en las vainas, el daño más extremo por Plomo muestra las hojas con clorosis generalizada y muy poco vigor, con reducción de tamaño y encrespamiento de sus limbos foliares, por consiguiente hay reducción considerable del área fotosintéticamente activa, esto puede ser a consecuencia de un notorio daño a cloroplastos, como se apreció y discutió en los efectos citológicos producto de los exosíntomas (Figura 20, E2P- E5P).

Juarez *et al.*, (2012) analizan que ante concentraciones muy altas de metales pesados como Cu, Zn, Ca, Ni, Pb, Cr, ocurre la presencia de síntomas cloróticos extremos en los cultivos expuestos, afectando directamente las respuestas de las plantas a situaciones de estrés férrico, debido a que se inhibe considerablemente la función de la reductasa férrica que ésta presente en la raíz. Estos autores destacan que estos iones metálicos pesados compiten directamente con el Fe^{2+} a nivel de la absorción por las zonas de transporte. Zaharieva y Romleld (2000), argumentan que un metal pesado como el Cd y el Pb, pueden llegar a tener más afinidad por los sistemas de transporte a consecuencia de una alteración estructural o bioquímica que ejerce sobre las plantas, hecho este aún poco aclarado.

Investigaciones realizadas por Poschenrieder *et al.*, (1989) y Sandalio *et al.*, (2001), llegaron a determinar situaciones similares a las encontradas aquí en este estudio, cuando sembraron plantas de frijol y alverja, respectivamente en suelos contaminados con Cadmio, observando modificaciones en la apertura y resistencia estomática, fotosíntesis, desbalance en los contenidos de ácido abscísico, transpiración y potenciales hídricos, cuando compararon las plantas expuestas en relación a suelos no contaminados.

Esta tesis encaminó el estudio de variables morfofisiométricas complementadas con las observaciones fisiopáticas gracias a la ayuda de los sistemas hidropónico con soluciones Hoagland más las sales metalíferas inductoras de estrés. Esto hizo posible encontrar respuestas que expliquen las fisiopatías características por causa de un elemento o compuesto xenobiótico, pero también la contravía que explique los procesos que tienen las plantas a tolerar concentraciones elevadas de éstos tóxicos, generados en buena parte por las actividades del hombre y que contaminan sustratos, suelos y aguas de riego. Entender como algunas plantas se desencadenan mecanismos que restringen la absorción

y translocación de estos iones patógenos hacia las hojas, y como en mayor parte se acumulan en la raíz, como en el caso de estas poaceas (Yoshida *et al.*, 2004). Pero que igualmente quedé abierto el estudio para seguir dilucidando como otras plantas como las metalíferas quizás absorben y acumulan activamente estos metales en su biomasa, lo que conduce a explicar fenómenos avanzados en su fisiología del estrés, en función de estrategias de coadaptación o coevolución (Gupta *et al.*, 2013).

3.2.5 Conclusiones

El estrés inducido con metales pesados en *B. arrecta*, resulto efectivo para diseñar la escala valorativa de daños crecientes. Esta escala representa una herramienta para estudios de pasturas como bioindicadoras o biomonitoras en estudios de toxicología ambiental.

El estrés metalífero inducido en estas pasturas, analizado desde el diagnóstico fisio (pático es un catión divalente que genera antagonismo o sinergismo con elementos y microelementos esenciales, proporcionando un detrimento y disturbio fisiológico, donde la nuevas moléculas generan una respuesta ante la agresión química del xenobiótico con un efecto bioquímico (generalmente daño por el agente causal abiótico).

La tolerancia al estrés metalífero en estas pasturas, esta mediada por la bioacumulación mayor en sus raíces. Presentado en algunos casos recuperación parcial de la pastura.

Para todos los casos el efecto patológico por bioacumulación por Cadmio y Plomo, se comprobó que hubo efecto inhibitorio del crecimiento aéreo y telúrico de la pastura.

3.3.EVIDENCIA DE CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES CAUSADOS POR CADMIO Y PLOMO EN TEJIDOS DE *Brachiaria arrecta* (HACK. EX T. DURAND & SCHINZ) STENT.

RESUMEN

Se evaluaron fisiopatías en *Brachiaria arrecta* (*B. radicans*) expuestas a contenidos tóxicos de Cadmio y Plomo en el invernadero de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, se doparon plántulas sanas de 20 días de edad bajo cultivo hidropónico. El objetivo fue describir síntomas crecientes por intoxicación con el diseño de una escala valorativa de daños crecientes complementada con observaciones de ultraestructura de tejidos de raíz tallo y hojas mediante Microscopía Óptica de Alta Resolución y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). El material vegetal fue sometido a estrés abiótico con los tratamientos de sales de CdCl_2 en concentraciones medias o permitidas y altas o anómalas de 1.5 y 10 ppm, al igual que la sales $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a concentraciones permitidas y anómalas de 150 y 500 ppm, respectivamente. Los resultados principales mostraron un mayor detrimento cuando las plantas fueron expuestas al metal Plomo en ambas concentraciones, que al Cadmio en los tejidos raíces>tallos>hojas. Se apreciaron deformaciones extremas en paredes celulares de las células del cortex y en la endodermis de la raíz; en las hojas los daños fueron notorios para ambos metales especialmente en el parénquima clorofiliano y en la deformación de paredes de la epidermis tanto en haz como envés. En los tallos aparecieron deformaciones de las células del parénquima de relleno cuando ocurre bioacumulación intensa de Plomo. Estos resultados sugieren que la bioconcentración en los tejidos vegetales de estas pasturas de trópico bajo ocasiona trastornos histológicos, sumado a las consecuencias posteriores en la red trófica y en la Salud Pública.

Palabras claves: estrés abiótico, metales pesados, pastura tropical, Poacéas.

ABSTRACT

We assessed physiological and anatomical changes in *Brachiaria arrecta* (*B. radicans*) exposed to toxic contents of cadmium and lead in the greenhouse of the National University of Colombia Palmira, healthy seedlings of 20 days of age were doped under hydroponics. The aim was to describe increasing symptoms of poisoning with a design rating scale of increasing damage ultrastructure observations complemented root tissue stem and leaves by High Resolution Optical Microscopy and Ultrastructure Electron Microscopy (TEM). The plant material was subjected to abiotic stress treatments with CdCl_2 salts of average or permitted concentrations and high or abnormal of 1.5 and 10 ppm, as well as the salts $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ and anomalous allowable concentrations of 150 and 500 ppm, respectively. The main results showed a greater detrimental when plants were exposed to lead metal cadmium in the roots, stems and leaves. Extreme deformations were observed in walls of cells in the cortex and endodermis of the root, the leaves were noticeable damage by both metals especially chlorophyll parenchyma and in the walls of the deformation of both beam epidermis as undersides; in stems appeared deformations parenchymal cells when filling occurs intense lead bioaccumulation. These results suggest that bioconcentration in plant.

Keywords: abiotic stress, heavy metals, tropical pastures, grasses.

3.3.1 Marco teórico

“Una lesión tisular empieza con alteraciones moleculares o estructurales en las células”

R. Virchow

Cuando ocurre una secuencia de estímulos inusuales (por un agente etiológicos biótico o abiótico) se presenta por consiguiente una demanda funcional alterada sobre las células y los tejidos, impactando fuertemente sobre estas como conjuntos y como sistemas vivientes en su entorno ambiental, es decir se rompen un equilibrio hemostático entre las células y su medio. Autores como Chisholm *et al.*, en el 2006, mencionan que cuando una célula se adaptada o se enferma es el resultante una alteración o daño sobre la estructura y el funcionamiento celular. Es decir, cuando el daño es inducido por un agente patogénico y las células dan su respuesta, en el tiempo estas se adaptan, se enferman o mueren. El estímulo inusual o la demanda alterada es de una magnitud tal, que posiblemente exceda la capacidad celular o tisular de ajustarse a la nueva situación da como resultado un estado de no adaptación o estrés celular (Salisbury y Ross, 1994 1994; Lichtenthaler, 1996), se genera entonces alteraciones o cambios morfológicos y funcionales muy diversos, que revelan un estado de daño celular reversible (tolerancia o resistencia) o enfermedad celular (degradación o muerte celular programada), o un estado avanzado de daño celular irreversible o muerte celular (lisis o necrosis) (Arkhipchuk *et al.*, 2000).

Las poblaciones vegetales de *Brachiaria* spp, son producto del fitomejoramiento en el trópico por disciplinas de centros de investigación tanto nacionales como internacionales, por sus excelentes cualidades forrajeras como tolerancia a estreses abióticos entre otros: las sequías, las bajas fertilizaciones, los suelos ácidos y los excesos de humedad (Canchila *et al.*, 2010). Sin embargo, hay un vacío en el conocimiento relacionado con estrés por presencia y bioacumulación de metales pesados tóxicos en estos agroecosistemas forrajeros, a nivel de trópico, cuando existe un factor predisponente como es una actividad antropogénica.

En la actualidad, los metales pesados tienen un gran significado como indicadores de la calidad ecológica de suelos debido a su toxicidad y muy especialmente al comportamiento

bioacumulativo en agroecosistemas (Sánchez *et al.*, 2007). La acción de los metales es de gran importancia debido a esta propiedad de bioacumulación, toxicidad y efectos directos a la salud todo tipo de sistema viviente en las relaciones suelo-agua-planta y ser humano (Weng *et al.*, 2001). Ya se menciona como en el trópico es muy reconocida, la tolerancia de forrajes como las especies de *Brachiaria* a suelos con baja fertilidad, inundados y a veces en condiciones de sequía, esto se debe a que estas poáceas tienen la virtud de poseer una capacidad amplia de adaptación a los ambientes rústicos, lo que redundo en ciertas características agronómicas, como son: la producción de hojas y pequeños rizomas que facilitan la emergencia de los tallos, su tasa de crecimiento y su alta capacidad para la producción de forraje en condiciones estresantes (Olivera, 2009).

En las etapas previas de esta investigación se determinó que las especies de *Brachiaria* también presentaban tolerancia a la presencia de los metales Cd y Pb, y que por sus características de ser plantas dominantes dados a sus atributos competitivos podrían ser plantas bioindicadoras o biomonitoras de presencia metalífera en focos de contaminación antropogénica.

Las brachiarias una vez que se adaptan a los suelos adversos y superan las condiciones de estrés logran mantener su viabilidad y razón de sobrevivencia (Zadok y Shein, 1979). Por lo tanto, según los resultados previos de esta investigación se podrían utilizar a estas especies como modelos experimentales en programas de monitoreo de contaminación de actividad agrícola e industrial, por sus particularidad de ser organismos sedentarios, base de la cadena alimenticia y sensibles a las variaciones medioambientales, reaccionan rápido ante la presencia de contaminantes metalífero como se demostró con anterioridad, lo que las convierte en elementos idóneos para el monitoreo de la contaminación. De acuerdo con investigadores como (Phillips, 1997; Ferrat *et al.*, 2003; Gianazza *et al.*, 2007), para que un organismo pueda ser empleado como bioindicador en actividades de vigilancia epidemiológica ambiental como monitor debe reunir las siguientes características: ser abundante, sedentario y representativo del área de estudio, acumular grandes cantidades del contaminante sin experimentar efectos tóxicos, distribuirse en una amplia extensión geográfica, resultar de simple identificación y muestreo, además de proveer suficiente cantidad de tejido.

Estudios realizados por Bernard *et al.*, (2008), señala que las plantas desempeñan una función vital en los ecosistemas, siendo por consiguiente poblaciones que se utilizado para la diagnosis o predicción de las consecuencias negativas de actividades antropogénicas, al estudiar la complejidad de su fisiología y adaptación anatómica a un estrés por lo que estas plantas producen, respuestas bioquímicas, mecanismos de adaptación y en otros casos mortalidad. Estos investigadores mencionan que las respuestas que tienen lugar en los organismos como consecuencia del efecto de un contaminante se han denominado biomarcadores (Mussali *et al.*, 2013). Un biomarcador o bioindicador puede definirse como las variación bioquímica, celular, fisiológica o comportamental que pueden ser medidas en el tejido, en los fluidos corporales y/o a nivel del organismo completo, y brindan evidencia de la exposición a uno o más componentes químicos. De acuerdo con estos autores, los biomarcadores brindan posibilidad de recopilar información relevante sobre potenciales impactos de los contaminantes tóxicos en la sanidad de los organismos, agroecosistemas y ecosistemas naturales. Un biomarcador puede dejar en evidencia síntomas tempranos del daño causado por el contaminante y, por consiguiente podrían indicar acciones de alarma ante la presencia de un xenobiótico químico.

La utilización de plantas superiores, por ser organismos eucarióticos encaja perfectamente en un programa de seguimiento que conlleve a estudios de monitoreo de contaminantes químicos bioacumulables (Rodríguez, 2003). Se han empleado algunas plantas para fines de bioensayos rápidos, debido a la respuesta que presentan ante cualquier sustancia química (Dovgaliuk *et al.*, 2001) o mezcla compleja de tóxicos presentes (Fang *et al.*, 2001; Grover y Kaus, 1999).

En este trabajo, se evaluó el grado de respuesta de los tejidos vegetales de la poaceae *Brachiaria arrecta* una vez que se expongan a concentraciones altas de dos metales pesados como Cadmio y Plomo, para así, caracterizar los daños a nivel ultraestructural de estos cationes divalentes en relación a los cambios anatómicos bajo estrés inducido, de esta manera se propone la utilización de estas técnicas microscópicas como herramientas de diagnóstico precoz en relación a la identificación temprana de estos daños en tejidos y células, siendo este un resultado de un bioindicador hasta el momento poco utilizado como herramienta de diagnóstico, ante las contaminaciones por Cadmio y Plomo.

3.3.2 Trabajos relacionados

Vera (2009), encontró alteraciones físicas como ganchos, nódulos, formación de raíces laterales, adelgazamiento y ablandamiento en raíces de *Allium* tratadas con mercurocromo a las concentraciones de 10, 50, 100, 250 y 500 μM .

Wojcik y Tukendorf, (2004). Emplearon Cadmio como agente genotóxico en *Allium cepa*, encontrando que este metal se bioacumula en estas plantas principalmente en raíces y hojas, ocasionando desórdenes en su fisiología y morfología inhibiendo el crecimiento, por competir bioquímicamente con metales esenciales como el Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Ca^{2+} en la raíz, y disminuyendo la concentración de clorofila hasta en 60 % en las hojas

Fusconia *et al.*, 2006 en intoxicaciones con Cd demostraron que este patógeno abiótico causó una inhibición en el crecimiento de las raíces de *Pisum sativum*, cuando utilizaron soluciones de Cadmio a 250 μM , después de 24 horas de tratamiento, por daño genotóxico que afectó la actividad meristemática en los puntos de crecimiento radical.

3.3.3 Materiales y métodos

- **Localización.** Para el cumplimiento de este objetivo, la investigación fue desarrollada en dos fases: inicialmente en el invernadero donde se doparon las plantas de *B. arrecta* y posteriormente una vez las plantas fueron expuestas a los tratamientos se llevaron al laboratorio de microscopía electrónica de la Universidad Nacional Sede Palmira, para realizar las observaciones pertinentes de daños en tejidos y en células de raíces, tallos y hojas.
- **Material vegetal.** El material vegetal se obtuvo a partir de la recolección y acceso de plantas de *Brachiaria arrecta* (Poaceae), provenientes de zonas contaminadas por actividades petroleras en los campos industriales de exploración de pozos en Casabe en el municipio de Yondó, Antioquía (N 7.039775, W -73.918277) y el campo de refinería de Ecopetrol en el corregimiento del Centro en Barrancabermeja (N 6.937722, W-73.761419)

en el Magdalena Medio Colombiano, en ambas zonas se encontró bovinos pastoreando. Una vez recolectado el material vegetal, se realizaron las accesiones correspondientes y se creó un banco de plantas madres para las siguientes etapas de la investigación. Las muestras fueron tomadas siguiendo la metodología propuesta por Sánchez (2010), consistente en recolectar material vegetal, empleando bolsas plásticas con sellado hermético, las cuales se enviaron refrigeradas para evitar la fuga de alguna sustancia volátil.

3.3.4 Procedimiento experimental

En la etapa de invernadero se conservaron las plantas de *Brachiaria arrecta*, para la posterior fase de evaluación. Una vez que se obtuvo las plántulas de 20 días propagadas en sustrato de turba para lograr un enraizamiento vigoroso, como etapa previa al establecimiento del cultivo hidropónico siguiendo la metodología de Shannon *et al.*, (2009) descrita en 3.2.3.

Las plantas fueron sometidas a estrés por dopaje con concentraciones anómalas de estos dos metales pesados en sales (Cuadro13), aplicado en “drenchs” sobre los cuellos en los tallos de las plántulas que reposaban en el sustrato compuesto por arenas de cuarzo, siguiendo la metodología de Brown y Hock(1988). Las concentraciones en los sustratos se hicieron con base a los criterios internacionales, se tomaron niveles de Cd a 10 ppm y para Plomo de 500 ppm, que están dentro de los rangos de niveles tóxicos en plantas cultivadas para suelos contaminados, según Bowie y Thornston (1985), como anormal hasta 30 ppm. Para Plomo como anormal hasta ≥ 720 ppm.

Cuadro 14. Tratamientos aplicados en la solución hidropónica

TRATAMIENTOS	Concentración y nivel del metal
Cadmio	10 ppm (Anómalo)
Plomo	500 ppm (Anómalo)
Testigo	Solución nutritiva Hoagland

Fuente: Peláez, M. 2013.

Las observaciones sobre los daños fitotóxicos inducidos, por los tratamientos fueron evaluados siguiendo una escala de reacciones crecientes, diseñada y propuesta por el autor, ante la ausencia de otras escalas como parámetros de comparación fruto de otras investigaciones de este tipo, donde se tuvieron en cuenta interacciones planta-patógeno (abiótico) o disturbio fisiológico por el estrés metalífero en pasturas de trópico, especialmente agroecosistemas de *Brachiaria*.

Se tomaron muestras del material vegetal expuesto a las 96 horas, cuando presentaron daño moderado (DM) descrito en el aparte anterior de la escala de reacciones crecientes diseñada en esta investigación cuando las hojas mostraron síntomas de perder turgencia, aparición de ligeras clorosis, pérdida en la funcionalidad de las raíces entre un 25 y 50 por ciento, mostrando colaraciones rojizas en unas o en el conjunto de las raíces (Escala de reacciones: estadios crecientes por toxicidad de metales pesados Cadmio y Plomo en *B. arrecta* (*B. radicans*), Peláez (2013).

3.3.5 Procedimiento y observación de ultraestructuras

Para observar la ultraestructura de los tejidos (raíces, tallo y follaje), se recolectaron y procesaron las muestras de cada planta a estudiar incluyendo el material testigo. El procedimiento utilizado fue el de "resina Spurr" para observaciones vegetales (Mercer y Birberk, 1966), El material vegetal de 1mm de grosor se conservó en glutaraldehído al 2% por 8 horas, se realizaron dos lavados con buffer fosfato 0.1M con un pH de 7.2, se

posfijaron con tetraóxido de osmio al 1% a temperatura ambiente durante 2 horas, se lavó tres veces con agua destilada, la deshidratación se realizó con etanol en concentraciones de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, y dos repeticiones al 100% por un periodo de 15 minutos por cada cambio, se embebió en acetona pura tres veces por 20 minutos, la inclusión con resina Spurr se colocó en una parte de acetona y una parte de resina Spurr durante 1 hora, posteriormente se embebió dos veces en resina pura por un periodo de 1 hora por cambio, el material orgánico se depositó en moldes con resina Spurr y se polimerizó a 60°C por 48 horas.

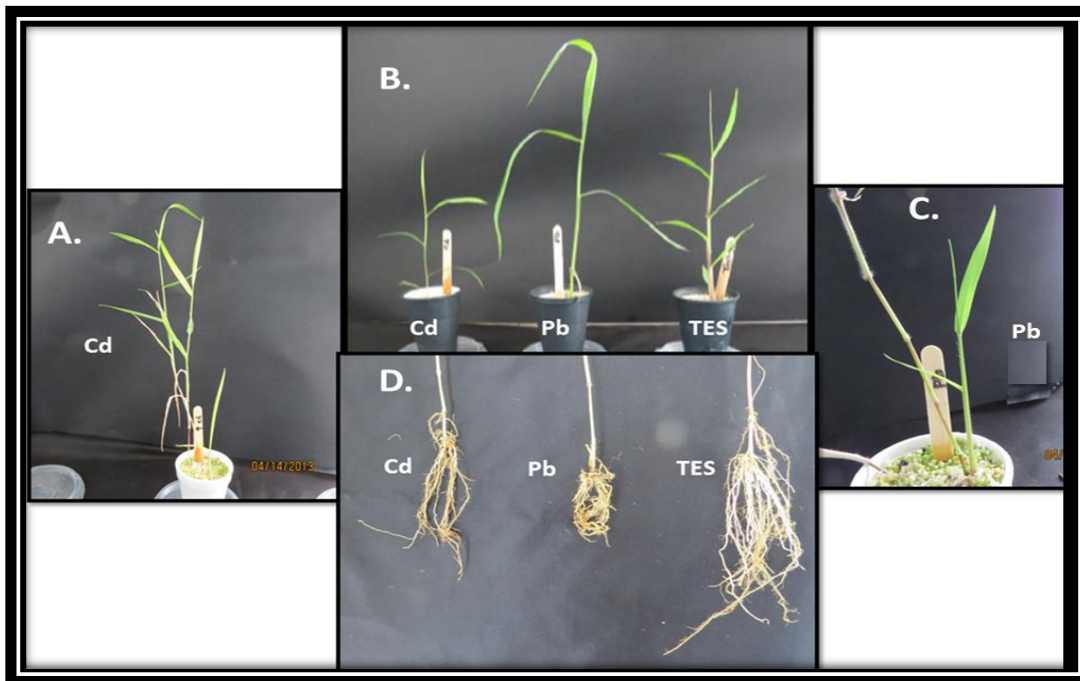
Los cortes semifinos de 300 (nm) nanómetros de grosor se realizaron en el ultramicrotomo RCM XL con cuchilla de diamante y se colorearon con azul de toluidina al 2% en plancha de calentamiento; las fotografías se tomaron en la Unidad de Microscopia Electrónica de la Universidad del Cauca en un microscopio óptico Nikon 80i a 4, 10 y 40X.

3.3.6 Resultados y discusión

- **Observación de daño a tejidos.** El conocimiento del mecanismo de acción de las contaminantes xenobióticos como el Cadmio y el Plomo y su acción tóxica sobre los tejidos fundamentales de esta poaceae ampliamente cultivada en zonas expuestas a la contaminación antrópica como la minería o la explotación de crudo (Sánchez *et al.*, 2007), ha permitido no sólo definir sus particularidades estructurales, sino comprender la interrupción de muchos procesos vitales en la fisiología de esta pastura de trópico bajo, como el bloqueo de sus conectores los canales de Ca^{2+} y K^+ . Se discutió como el Cadmio y el Plomo afectan el sistema membranoso cuando penetran disueltos en las células vegetales, afectando el citoplasma vivo, el metabolismo y los procesos bioquímicos. El desbalance en contenidos hídricos afecto los potenciales haciéndolos más negativos generando problemas de pérdida de turgencia en tejidos, clorosis, marchitamiento y necrosis extremas en otros casos.

En la Figura 31, se muestra los daños macroscópicos al estrés metalífero inducido, donde se observa síntomas aéreos y telúricos para ambos metales, apreciándose como las plantas expuestas al Cadmio y Plomo presentan, clorosis, deformaciones y centros

necróticos sobre todo en las hojas bajas, en las hojas jóvenes se presentan clorosis y retardo en el crecimiento, siendo estas observaciones preliminares variables con utilidad biomarcadora (Bernard, 2008).



Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 31. Síntomas macroscópicos de *B. arrecta* intoxicadas con Cd y Pb: A. planta presentando daños fisiopáticos por Cadmio en tallo y hojas; B. síntomas en tallos y hojas del conjunto de plantas; Síntomas en tallo y hojas del daño por Plomo; D. Fisiopatías por Cadmio y Plomo en raíces. Letras diferentes indican que hay diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$)

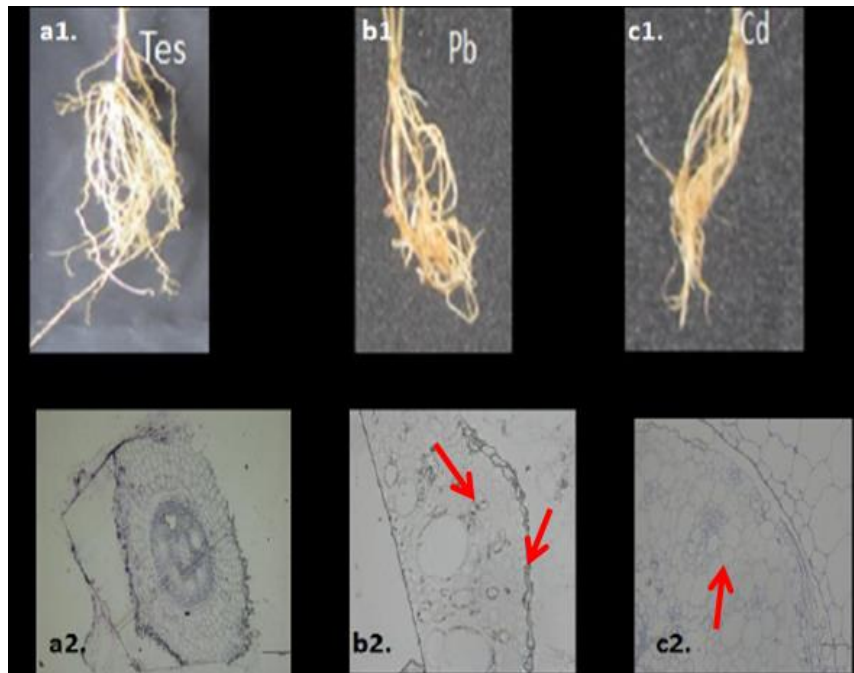
En las raíces expuestas hay pérdida de funciones debido a que hay daños celulares, daños al ADN, daños a proteínas y membranas, por consiguiente no hay transporte de minerales que si son esenciales en la nutrición como el calcio, el potasio el magnesio (Iannacone y Alvariño, 2005; Zhou y Qiu., 2005).

Las raíces afectadas por el estrés inducido aparentemente son numerosas, en relación al número de las raíces que funcionan, presentan un ligero color castaño claro. Las raíces presentan retardo en su crecimiento, si bien no hay tanta pérdida de funciones como el caso de las afectadas por Cadmio, si es muy notoria la reducción en longitud. Con respecto al daño en los tejidos de la raíz y su pronunciado efecto patológico (por estrés fitotóxico), en las paredes celulares del cortex y la epidermis observados en la ultraestructura, catión divalente Pb^{2+} , sustituye al Ca^{2+} , este último, es un constituyente primario de la pared celular de los vegetales. Investigadores como Clemens *et al.*, (2002), atribuyen este fenómeno de sustitución a mecanismos tóxicos como la suplantación de cationes polivalentes (esencialmente calcio y zinc) involucrados en las maquinarias moleculares de las plantas, esto es permisible por la estructura iónica similar de estos cationes tóxicos, lo cual facilita positivamente el reconocimiento de interacciones altamente compatibles con los grupos que regulan el transporte y la entrada de los cationes polivalentes en las proteínas, siendo inclusive según estos autores mucho más afines que el ion suplantado.

Esto se manifiesta en las bajas concentraciones de los cationes de Zinc (elemento muy similar al Cadmio), que favorecen un incremento inusitado de procesos de auto-oxidación en las membranas plasmáticas, de las células vegetales principalmente en raíces donde están ubicados los principales sitios de selectividad en la adquisición de cationes y aniones, lo que genera entonces graves trastornos en el ambiente celular; y por consiguiente hay tránsito desordenado de elementos metálicos, que llevan finalmente a inactivar enzimas específicas en la síntesis de proteínas y de los ácidos nucleicos responsables del crecimiento y desarrollo del sistema radical (Figura 32).

La fisiopatía por el estrés bioacumulado y a veces tóxico del Cd^{2+} y el Pb^{2+} se configura cuando es alterada la mecánica de acción bioquímica de las proteínas transportadoras para metales en el caso de Pb, los canales iónicos, las proteínas

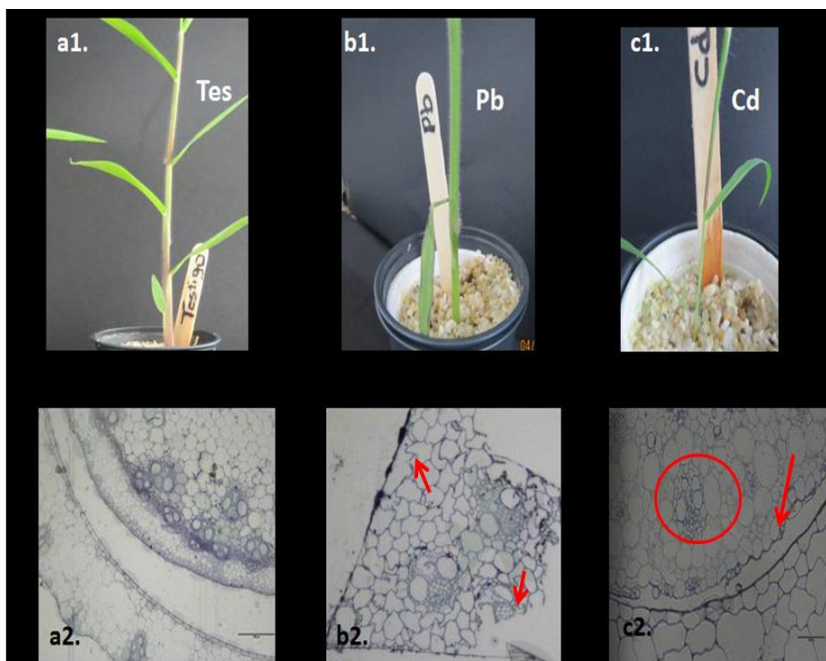
de adhesión celular, diversas enzimas y coenzimas metabólicas y proteínas de enlace a los ácidos nucleicos ADN y ARN, son el blanco patológico.



Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 32. Síntomas macroscópicos y ultraestructurales en raíces de *B.arrecta*: a1. Raíz testigo; a2. Corte trasversal de raíz testigo, técnica MOAR; b1. Raíz de planta expuesta 96 horas continuas al tóxico Pb; b2. Corte transversal, las flechas indicando daño en células de la epidermis y cortex por el estrés de Pb, Técnica MOAR; c1. Raíz expuesta 96 horas continuas al tóxico Cd; c2. Corte transversal, las flechas indicando daño en paredes celulares (apoplasto) por el estrés de Cd, técnica MOAR.

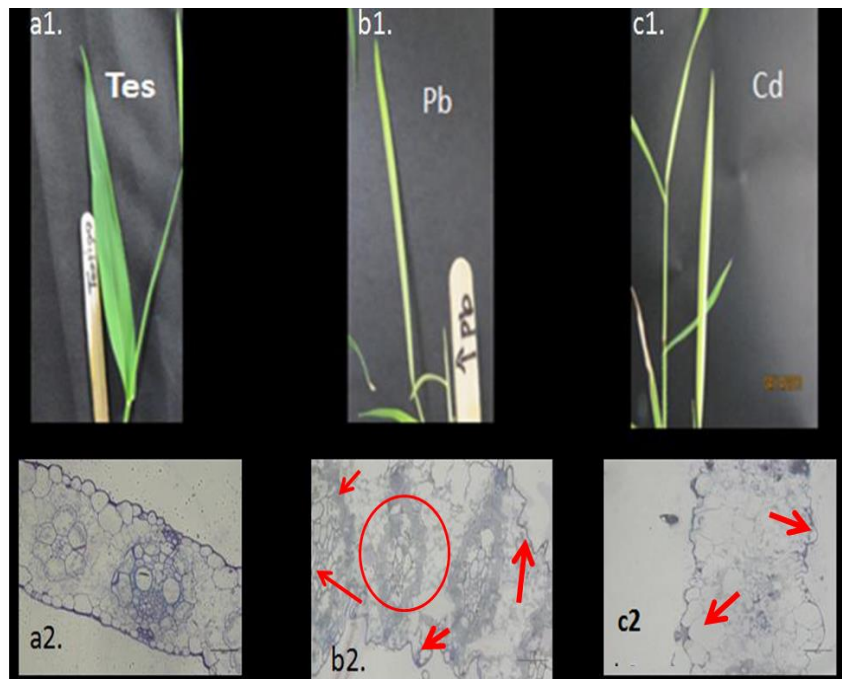
La (Figura 33), muestra la deformación de las paredes celulares por efecto del ión plomo, perdiendo la exagonalidad de las observadas en conjunto. Es posible que el efecto toxico se manifieste cuando este ión interacciona con los grupos constructores de la proteínas con respecto a los iones esenciales como el Ca^{2+} , ocasionado conformaciones anormales en de dichas proteínas a las cuales se une el toxico por sustitución, esto puede repercutir en el movimiento de solutos (vias apoplástica o simplástica y en la transpiración de la planta misma.



Fuente: Peláez, M. 2013.

Figura 33. Síntomas macroscópicos y ultraestructurales en tallos de *B. arrecta*: a1. Tallo testigo; a2. Corte trasversal de tallo testigo, técnica MOAR; b1. Tallo expuesto 96 horas continuas al tóxico Pb mostrando síntomas de senescencia y raquitismo; b2. Corte transversal, las flechas indicando daño en células de la epidermis y cortex por el estrés por Pb, técnica MOAR; c1. Tallo de planta expuesta 96 horas continuas al tóxico Cd mostrando senescencia prematura, c2 Corte transversal, la flechas indicando daño en células de la epidermis y el círculo mostrando deformación del haz vascular por el estrés por Cd, técnica MOAR

Los sitios de unión para cationes polivalentes ocupados por el Plomo, preferentemente son los mismos de unión al Calcio lo que configura el rol tóxico del metal, ya que el Ca^{2+} es muy importante en la estructura de tejidos y en la fisiología vegetal. Muchas de las alteraciones ocasionadas por el Plomo se relacionan con el metabolismo celular del Calcio y los distintos procesos celulares que dependen de él (Marschner, 1997).



Fuente: Peláez, M. 2013

Figura 34. Síntomas macroscópicos y ultraestructurales en hojas de *B. arrecta*: a1. Hoja testigo; a2. Corte transversal de hoja testigo, técnica MOAR; b1. Hoja de planta expuesta 96 horas continuas al tóxico Pb mostrando clorosis ligera, acompañado de rayado, vainas de las hojas jóvenes envueltas; b2. Corte transversal, las flechas indicando daño en células de la epidermis superior e inferior deformadas, parénquima clorofiliano anormal, haz vascular deformados por el estrés de Pb, técnica MOAR; c1. Hoja de planta expuesta 96 horas continuas al tóxico Cd mostrando clorosis fuerte, c2. Corte transversal, las flechas indicando daño en células de la epidermis abxial y adaxial, haces vasculares dañados por el estrés de Cd, técnica MOAR.

Entre estos, están los canales iónicos de la membrana celular, parece que es allí el blanco patogénico para el Plomo, si se analiza el funcionamiento celular integrado a la fisiología de intercambio de sustancias, relacionado con los potenciales hídricos y osmóticos, y a la conformación y función del citoesqueleto que es una estructura proteica que permite soportar la membrana plasmática, fenómeno este ampliamente discutido por Casierra (2001), para el estrés vegetal por aluminio, que impide el movimiento de vesículas y otros elementos intracelulares entre estos microtúbulos, filamentos de actina y filamentos

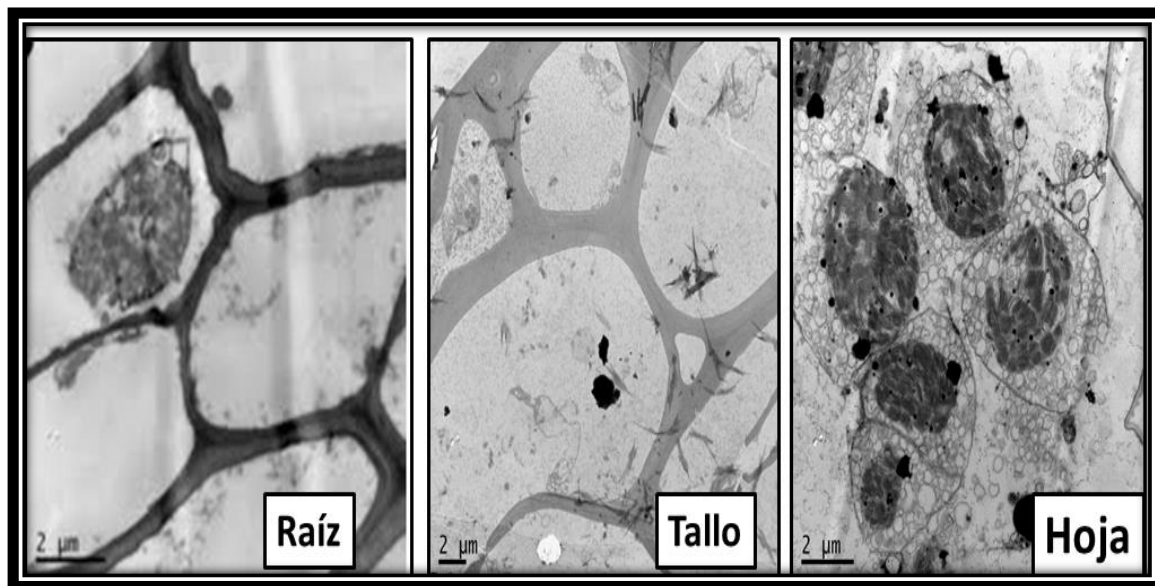
intermedios, importantes en la función de formar los husos acromáticos o mitóticos en el momento de la mitosis, esto explica el retardo en los crecimientos de la raíz, el tallo y las hojas.

El Plomo se distribuye en el interior de la célula, por lo que afecta organelas como el retículo endoplásmico, la mitocondria y el núcleo, lo que a su vez se traduce en alteraciones en la regulación intracelular del calcio, potasio y magnesio, elementos estos que son esenciales para cumplir los ciclos vitales de las plantas, desde el ensamblaje de proteínas, la generación de energía y la regulación genética (García, 2006). Por su parte las plantas que estuvieron expuestas al metal Plomo, presentan deformaciones de su limbo foliar, ligeros rayados en las hojas, posiblemente por desplazamiento de Zinc o Azufre y bloqueo de micronutrientes como Hierro, en estos casos los síntomas macro evidenciaron rayados cloróticos, y clorosis generalizadas, síntomas asociados a deficiencias en estas especies de *Brachiaria* a desplazamientos de Zn, S y bloqueo de iones de Hierro Fe, respectivamente (Maass *et al.*, 2002).

- **Observación de daños en células.** El análisis de los cambios morfológicos en los tejidos vegetales ocasionados por los dos metales se analizó por Microscopia Óptica de Alta Resolución, donde se hizo el “screening” o selección de tejidos alterados por la acción patógena del metal, con el fin ulterior de centrar la atención en los daños en la célula, en ambos casos se utilizaron los cultivos expuestos a 10 ppm con la sales CdCl_2 y 500 ppm de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a las 96 horas, concentración y tiempo en que se produce un efecto significativo sobre los parámetros fisiológicos evaluados en el presente trabajo (peso fresco y seco de raíces, diámetro y volumen de raíces, área foliar, longitud de raíces, longitud de la planta y presión hídrica, entre otras,). Se presenta en la (Figura 34), las células normales en raíz, tallo y hojas, de plantas que crecieron en solución nutritiva de Hoagland, después de 96 horas.

Los cambios ultraestructurales en *Brachiaria arrecta*, se evidenciaron en los cultivos expuestos a la acción metalífera del Cadmio y el Plomo, observándose alteraciones en la morfología de los cloroplastos con respecto a los controles (Figura 35 y 36 control, expuesta a Cd (Figura 37), y expuesta al Pb, (Figura 38).

Entre las malformaciones observadas a nivel de los cloroplastos resaltadas en las Figuras 37 y 38), aparece en los estromas cierto aspecto granuloso y electrodens, posibleblemente por una producción desbordada de plastoglobulos con un cambio osmótico de los tilacoides apareciendo más plamolizados, para la acción patógena del Cd y desaparición posterior del contenido de las granas con vaciado de los tilacoides y retracción de las membranas (Figura 40 c, c1).



Fuente: Peláez, M. 2013

Figura 35. Microfotografías de células normales de *B. arrecta* en raíz, tallo y hoja.

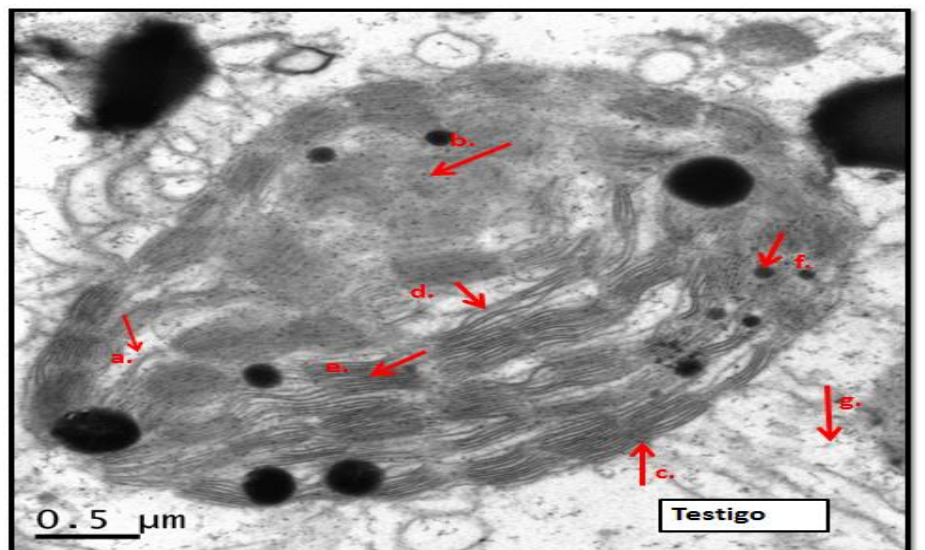
Más drástico, es el caso es la acción del ion Pb^{2+} que produce el colapso de las células y aumento en los espacios estromáticos, alcanzando su accionar en las membranas externas e internas de los cloroplastos y de las células del parénquima clorofiliano (Figura 38). Donde se observa un deposito posiblemente del metal a lo largo de la membrana exterior del cloroplasto y que es el mismo deposito de partículas que se adhiere en las paredes de las células clorofilianas (Figura 40, e y f). Por lo general, el parénquima en empalizada es primeramente afectado por la acción del tóxico, seguidamente es el parénquima lagunar, se presenta acumulación de calosa en los tejidos, las paredes celulares se engruesan y se acumula sustancias pécticas (Albers *et al.*, 1996). En éste estudio, se observó que para el caso del Cadmio, si bien su efecto no deforma a los

cloroplastos como el ion Plomo, si se intensificó su efecto toxico en los tilacoides y granas como blanco de ataque (Chwil, 2005). A su vez, el Plomo dejo como blanco la destrucción de las membranas externas e internas del orgánulo y seguidamente ocasionó destrucción de granas y tilacoides. Finalmente, el transporte de carbohidratos se ve alterado por el colapso del floema y de la acumulación de gránulos de almidón en los cloroplastos (Salisbury y Ross, 1994).

Otras funciones de la planta que aparecen estar involucradas en el daño de los tilacoides como las presentadas en este caso son discutidas por Tambussi y otros (2000), quienes afirman que la producción de especies reactivas de oxigeno (ROS) en la vía de la reacción de Mehler pueden aumentar y promover el daño oxidativo en los componentes de los tilacóides, estos autores señalan que en hojas de plantas de trigo una vez se produce ión de anión superóxido por los tilacóides hay un aumento cuando las plantas han experimentado un severo estrés metabólico. Stohs y Bagchi (1995), señalan que una posible explicación a la toxicidad por metales pesados, es el estrés oxidativo producido por las especies de oxígeno reactivo (ROS) ocasionadas por diferentes mecanismos. Según Pinto *et al.*, (2003), para cationes como Cd^{2+} y Pb^{2+} estos no experimentan cambios redox, como si lo hacen Fe^{2+} o Cu^{2+} . Pero sí pueden operar como prooxidantes a través de la reducción drástica del contenido de glutatión (GSH), necesario para la síntesis de fitoquelatinas PCs, disminuyendo así su disponibilidad para la defensa antioxidante (Grill *et al.*, 1987, Rodríguez *et al.*, 2008).

Varios autores manifiestan que el estrés oxidativo producido por el cadmio ocasiona daños oxidativos a membranas por peroxidación lipídica, e igualmente se han descrito daños oxidativos a proteínas por formación de grupos carbonilo (Romero-Puertas *et al.*, 2002; Sandalio *et al.*, 2001; Wua *et al.* 2003; Balestrasse *et al.*, 2004). Varias enzimas antioxidantes como la ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), la superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD) y la catalasa (CAT), son las que defienden a la célula de acción ROS, pero ante la presencia de Cd y Pb estas enzimas experimentan reducción o baja actividad en función de la concentración del metal toxico en el medio de crecimiento, la duración del tratamiento expuesto, el tipo de tejido, la especie o variedad vegetal, entre otros (Sandalio *et al.*, 2001; Benavides *et al.*, 2005).

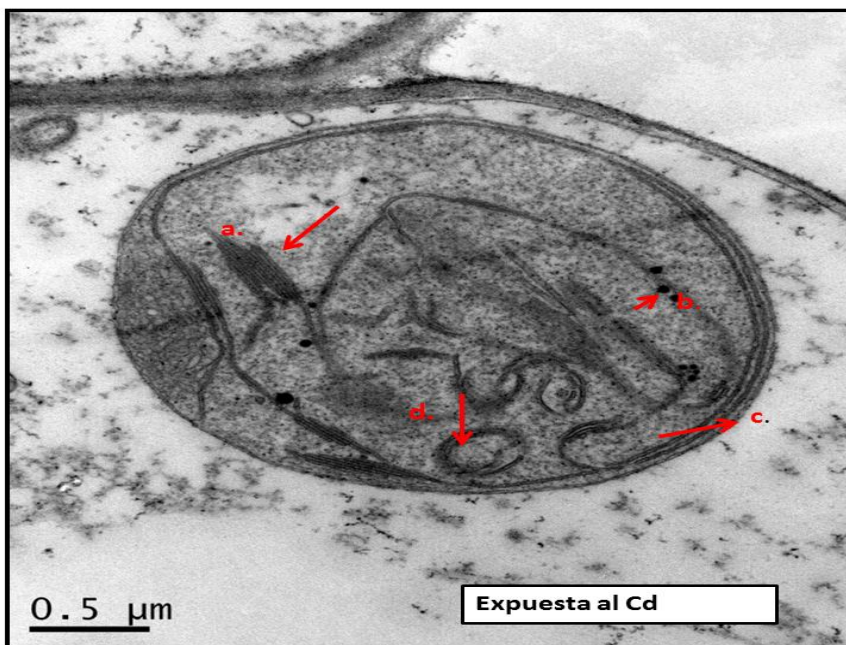
Algunos autores mencionan que el catión Pb^{2+} induce el estrés oxidativo en las plantas en crecimiento, debido a un aumento de la producción de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS) provocando un desequilibrio del estado redox celular (García, 2006), según este autor son pueden ser diferentes ROS: el anión superóxido (O_2^-), oxígeno singlete (1O_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidrófilo (OH), que pueden producirse durante el metabolismo normal oxidativo en organismos aeróbicos, pero estas ROS pueden ser destructivas si se producen en elevadas cantidades, puesto que aunque algunas ROS podrían funcionar como señales moleculares que alteran por consiguiente la expresión génica y la conformación de proteínas específicas de defensa. En esta investigación el daño a las membranas celulares y sus grados retracción se debió posiblemente a la acción tóxica de los metales que al estresar a las células generaron un estallido de producción de ROS en los sistemas tisulares y celulares de *B. arrecta*, en tiempos cortos mostrando daños por peroxidación de lípidos, en epidermis y en las células del cortex, en los cloroplastos y en el tonoplasto de las vacuolas (Verma y Dubey, 2003), lo que posiblemente tampoco facilitó la conformación de fitoquelatinas que ayudaran a secuestrar inones de Cadmio (Girroti, 1990).



Fuente: Peláez, M. 2013

Figura 36. Cloroplasto de hoja en el control después de 96 horas de estar la planta en solución nutritiva de Hoagland. Las flechas y letras: a. estroma, b. lumen, c. envoltorio, d. tilacoides, abundantes e, granas densas, f pigmentos fotosintéticos en abundancia, g. citoplasma.

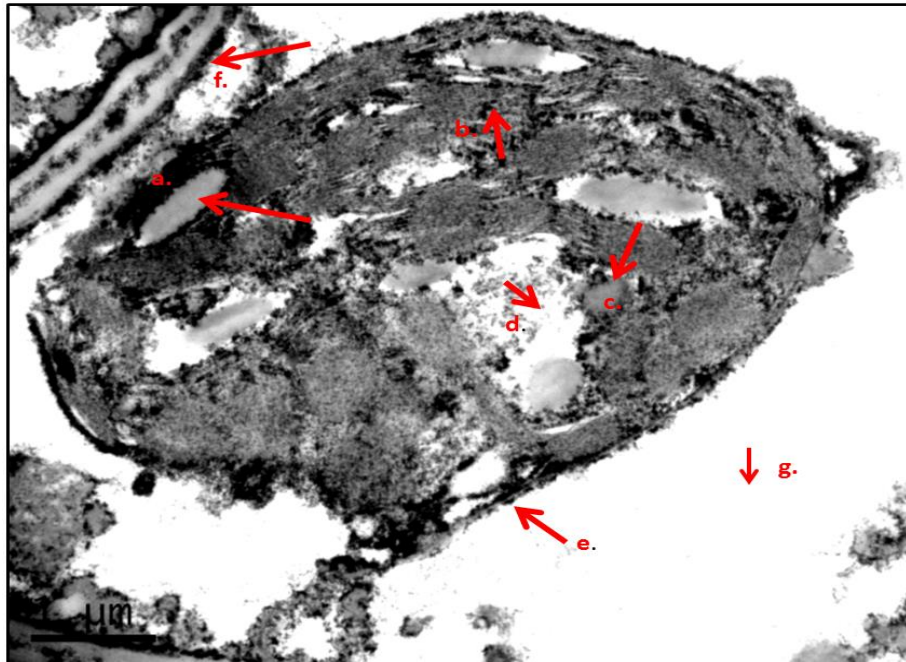
Otra función fisiológica afectada por los ROS producidos, es la tasa potencial de asimilación de CO_2 (es decir, la tasa fotosintética medida a concentraciones saturantes de CO_2 , esta acción podría ocasionar limitantes no estomáticas (o metabólicos) de la fotosíntesis cuando hay aumento de ROS (Pitzschke *et al*, 2006) generando el daño a los componentes del cloroplasto, como por probablemente ocurrió en las alteraciones a las membranas por los cationes tóxicos del el Cadmio (Figura 37) y el Plomo (Figura 38).



Fuente: Peláez, M. 2013

Figura 37. Daños a cloroplastos en células de hojas por Cadmio de una planta de *B. arrecta* expuesta a la sal CdCl_2 10 ppm, después de 96 horas. Notese, en la señal de las flechas y en las letras detalles de daños causados: a. Tilacoides comprimidos, b. disminución de los pigmentos fotosintéticos, c. compresión de doble membrana en el envoltorio, d. desaparición de granas y tilacoides.

Las Figuras 37 y 38, mostraron que una vez que las células quedaron expuestas a la acción de los tóxicos, se presentaron en todos los casos alteraciones en la estructura celular, como el aumento de las vacuolas con un creciente nivel de desorganización de los orgánulos como los cloroplastos, principalmente en la intoxicación por Pb^{2+} , con la intoxicación por Cd^{2+} se apreció algunas membranas retraídas.



Fuente: Peláez, M. 2013

Figura 38. Aspecto deformado de cloroplasto y daños a membranas y componentes de células de parénquima clorofiliano en hojas de *B. arrecta* expuesta a la sal $Pb(NO_3)_2$ 500 ppm, después de 96 horas. Nótese como en las flechas y letras muestran: a. gránulos de almidón en aumento, b. granos y tilacoides desordenados o desaparecen, c. aumento de plastoglobulos, d. estromas con aspecto electrodenso y granuloso, e. probable fijación de residuos de Plomo a las membrana externa del cloroplasto, f. fijación de residuos de Plomo a las membranas y pared celular, g. desaparición de contenido plasma celular alrededor de cloroplasto.

Cuando hay aumento en la vacuolización, posiblemente se explique este resultado por el efecto del metal sobre los sistemas de transportes responsables del mantenimiento de la osmolaridad celular (Korotkov *et al.*, 1998). El catión Cd^{2+} puede llegar a ocasionar inhibición de la ATPasa Na^{+2} y K^{+2} (Sengar *et al.*, 2008), lo que promueve un incremento inusitado de sodio intracelular presentándose retención de agua e histólisis celular (Koizumi *et al.*, 1996). La desorganización de los cloroplastos y de los tilacoides, se relaciona probablemente con una disminución de pigmentos fotosintéticos como resultado de ser un blanco de la acción tóxica de ambos metales, lo que afecta por consiguiente en

el sistema de transporte de electrones, disminuyendo las proporciones de citocromo/clorofila (Wang y Templeton, 1992).

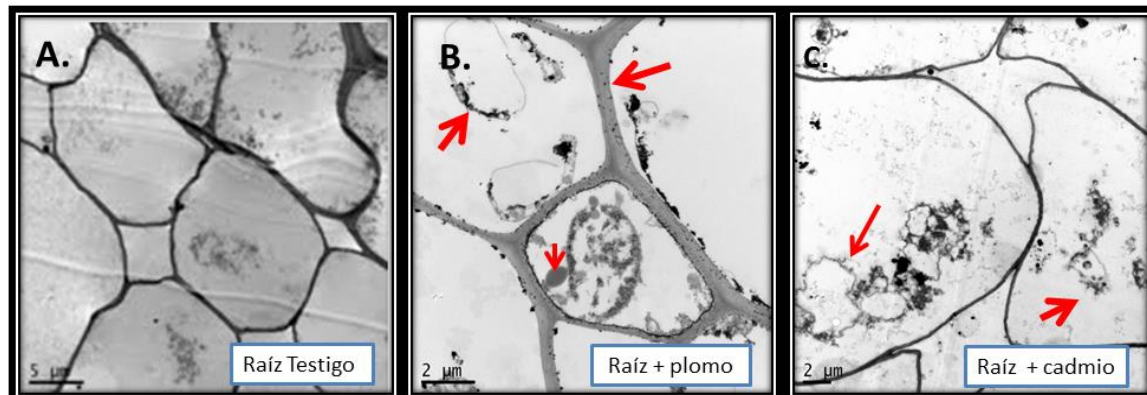
La desorganización del carotenoide, puede ser una señal de inhibición del crecimiento por la imposibilidad de las células de producir moléculas almacenadoras de energía, lo que conlleva con la interrupción de los procesos fotosintéticos por los carotenoides en los centros de reacción y de transferencia de energía, por consiguiente se desprotege el centro de reacción contra la autooxidación (Wellburn, 1994).

Sin embargo estas observaciones no coinciden con lo afirmado por Oancea *et al.*, (2005) quienes aplicaron nitrato de Plomo en plantas de ají (*Capsicum annum* L.) observando alteraciones en las actividades bioquímicas y en las funciones en la planta, estos investigadores explicaron que el nitrato de Pb incrementó el contenido de pigmentos fotosintéticos, y que no se observó modificaciones en la altura o biomasa de las plantas. No obstante, afirmaciones hechas por Kosobrukhov *et al.*, (2004), contradicen lo anterior y catalogando a él ion Plomo como causante de un considerable decremento en peso seco y una declinación en el contenido de clorofila, con disminución en la actividad fotosintética en plantas expuestas a Pb^{2+} , coincidiendo con lo encontrado en este estudio, cuando se evidencio daño notorio a los cloroplastos, con la consecuente disminución de pigmentos fotosintéticos, sin embargo aquí no se midió la actividad fotosintética lo que podría quedar para un estudio posterior.

En las raíces el daño ultraestructural se presentó en un aumento en las paredes celulares la epidemis y cortex, especialmente en la que conforman el simplasto donde se aprecia un engrosamiento notorio de las mismas, fenómeno observado tanto en MOAR como en TEM para las raíces expuestas a la acción del Plomo Figura 39 B, también hay un efecto sobre las membranas del citoplasma donde la patología ocasionada se expresa en la aparición de gránulos oscuros hacia el centro del núcleo, a consecuencia del proceso de una muerte celular programada o necrosis extrema (MCP), proceso similar a una apoptosis en células animales y que fue descrita por Danon y Gallois (1998) en *Arabidopsis thaliana* cuando indujeron en estas plantas radiaciones UV-C.

Ahora, en este trabajo el estrés ambiental por los metales pesados aplicados en especial el Plomo, provocó posiblemente condensaciones muy similares en las fibras proteicas que

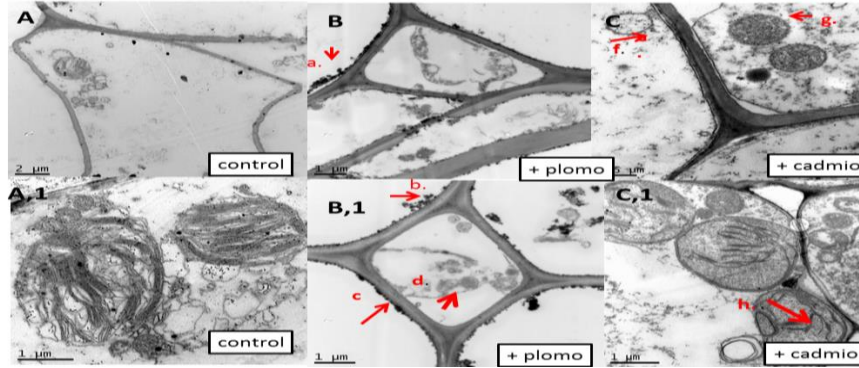
envuelven el núcleo apareciendo entonces unas masas lipídicas compactas o plastoglóbulos como producto del daño (Fig. 38a). (Wierzbicka, 1999).



Fuente: Peláez, M. 2013

Figura 39. Microfotografías de raíz de *B. arrecta*. A. Control a las 96 horas en solución nutritiva., B. raíz expuesta a Pb 500 ppm a las 96 horas, mostrando en las flechas engrosamientos de pared celular, aumento en los niveles de vacuolización, formación de gránulos en la membrana nuclear., C. raíz expuesta a Cd 10 ppm a las 96 horas, la flecha en rojo muestra formación de gránulos y formación de vacuolas.

Los tejidos de la raíz y tallo generan una absorción desbordada y descontrolada de minerales, incrementando la tasa de transpiración. Si se tiene como parámetro comparativo un testigo de *B. arrecta*, el cual tiene todas sus raíces funcionales mostrando diámetros heterogéneos en su conjunto y sumados al volumen radical de las mismas. Es posible entonces evidenciar daños tisulares por la acción patógena de estos metales pesados (Figura 39 B y 39C). En la ultraestructura se muestra un efecto del catión Plomo deteriorante en paredes celulares de la epidermis y las células del cortex, apareciendo más intenso los daños por Plomo, que por el mismo Cadmio, como resultado se presenta un estrés oxidativo que daña los tejidos y células (Figura 40, b1,b2,c1y c2.), (García, 2006).



Fuente: Peláez, M. 2013

Figura 40. Microfotografías de tallo de *B. arrecta*. Planta control a las 96 horas en solución nutritiva de Hoagland, mostrando aspectos de la pared celular (A) y de los cloroplastos. (A1), Nótese la densidad alta de granas y tilacoides. (B. y B, 1). Tallo expuesta a Pb 500 ppm a las 96 horas, mostrando en las flechas en rojo engrosamientos de pared celular con depósitos generalizados del metal en las paredes (a,b y c), d. aumento en los niveles de vacuolización, lisis del núcleo, formación de gránulos en la membrana nuclear, (C y C,1). Tallo expuesta a Cd 10 ppm a las 96 horas, las flecha en rojo en (f), destrucción de las membranas en mitocondrias, (g) mitocondrias sin alteración, (h) cloroplasto, con destrucción de tilacóides y granas.

Los minerales se absorben por flujo masal, en bombardeos al apoplasto que rodea a los elementos cribosos del xilema (Figura 39 A). Taiz y Zeiger (2009), argumentan la ocurrencia de alteraciones fisicoquímicas de las paredes celulares por trastornos enzimáticos en la biosíntesis de los constituyentes macromoleculares de la pared, cambios en la distribución de cargas y en el ensamblaje de los polímeros, cambios en la distribución de los microtubulos y del sistema endomenbranoso (aparato de Golgi) y/o cambios en la adhesión entre pared y membrana (Wierzbicka, 1998-1999).

En este sentido hay un desbalance de solutos que disminuye el potencial de agua en los elementos del xilema, generando una entrada de agua desde las células acompañantes (Salisbury y Ross, 1994). Este fenómeno se evidencio, con los bajos potenciales hídricos presentados en *B. arrecta* en este estudio, cuando se expusieron durante 96 horas a la acción toxica, en las células hubo aumentó en la presión del agua dentro del xilema, la cual

se forzó eventualmente a salir a través de las vainas endodérmicas en tallos y hojas (Salisbury y Ross, 1994).

El sistema celular vegetal ante la inminente muerte de algunos sus componentes como los orgánulos ante la inducción del estrés abiótico, es posible que los lisosomas que aparecen en aumento en las células del cortex y epidermis sea un producto de la reacción de la planta ante el estrés metalífero del Plomo y el Cadmio que es el sitio de mayor bioacumulación y blanco posterior al tóxico metalífero. Las características morfológicas de las células afectadas son: picnosis nuclear, grave encogimiento de la célula y compactación de los elementos ultraestructurales (Zoghiami *et al.*, 2006). También se comprobó que la intoxicación causa severos daños tanto estructurales en el citoesqueleto y ultraestructurales en las membranas citoplásmicas, afectando por consiguiente el transporte de nutrientes por los canales de Ca y K (Figura 40), (Salisbury y Ross, 1994).

En el presente estudio cuando las plantas de *B. arrecta* quedaron expuestas a eventos de estrés metalífero en el corto tiempo, fue posible que se redujera la actividad celular y el crecimiento de las plantas, a pesar de su capacidad para adaptarse a otra condición de relaciones de nuevos balances nutricionales por tolerancia al estrés, que inducen flujos metabólicos cambiantes, como respuesta a una acción tóxica del metal. Sin embargo, todo xenobiótico es por lo general un tóxico que puede llevar a un daño extremo y de manera eventual ocasionar una muerte celular programada o incluso una necrosis acelerada, que puede destruir los componentes de la célula (Arambasic *et al.*, 1995; Alberts *et al.*, 1996), si los mecanismos para afrontar o reparar el estrés se ven demasiado presionados por un ambiente anormal como se propocio en estos bioensayos.

Otro aspecto significativo en este estudio fué la utilización de las técnicas de microscopia óptica de alta resolución y la microscopia electrónica de transmisión para evidenciar procesos de muerte celular cuando hay un estrés ambiental extremo, para este caso la presencia de metales pesados que son agentes patogénicos que inducen lesiones primarias en todo el sistema de membranas tanto celular, mitocondrial, tilacoidal e incluso nuclear (Carrasco *et al.*, 2006). Con alteraciones que siguen un patrón de facetas desde necróticas en sus manifestaciones fuertes o leves cuando se presenta una posible muerte

celular programada (Danon y Gallois, 1998), ambas facetas involucran la entrada de iones metálicos al citosol bloqueando la entrada de nutrientes esenciales como calcio, magnesio, potasio, zinc y el propio hierro, entre otros.

Por consiguiente estos iones trazas tóxicos son sustituyentes que llegan a producir la activación de enzimas generan lesiones de las membranas celulares, por desbalance nutricional, que puede derivar en liberaciones al citosol de concentraciones anormales de iones como el propio calcio en el complejo líquido extracelular. Cuando hay un desbalance nutricional en el citoplasma se puede presentar descensos de ATP, se produce salida de iones de calcio de las mitocondrias, al citosol, activando las fosfolipasas y proteasas, las cuales actúan sobre la membrana celular, el citoesqueleto y la membrana de los orgánulos, ocasionando rupturas de dichas membranas y filamentos, como se apreció en el estrés severo de Plomo y Cadmio. Si hay ruptura de membranas celulares, hay por consiguiente daños celulares irreversibles, lo que condiciona un gradiente de iones de calcio al citosol y por consiguiente hay una mineralización desbalanceada en el citoplasma y en las membranas, esto conlleva a que se dañe la membrana de los lisosomas provocando la salida de las enzimas lisosomales, con lo que se produce la autodigestión (autólisis) (Hartwig, 1995).

Las concentraciones anómalas de estos dos metales, que en muchos casos son derivadas de situaciones o escenarios reales como la minería, la explotación de recursos no renovables, la industria y la agricultura intensiva al colocar grandes gradientes de efluentes como son estos metales ocasionan trastornos en los sistemas vivos (Green Choice Alliance, 2010), como se demostró aquí con esta pastura, que afectaron las etapas del ciclo de desarrollo celular y tisular correspondientes a los daños citotóxicos con efectos genotóxicos que pueden valorarse en un estudio posterior y que relacione eventualmente aspectos de la división celular (metafase y anafase), en donde se concluya que pueda presentarse continuidad de eventos donde se comprometa los ligandos cromosómicos, los cromosomas aislados y fragmentados del genoma de éstos con consecuencia a irreparable una vez ocurra el daño genético (Mastrangelo *et al.*, 2006).

Cardellá en el (2000) apunta con buen juicio que un metal pesado puede interferir en investigaciones experimentales a nivel de los sistemas celulares y/o moleculares. En los supuestos de que las plantas metalíferas poseen mecanismos de protección contra los

metales pesados (Garbisu y Alkorta, 2001), en donde los posibles daños citotóxicos que se exponen en este estudio sean probablemente resultado de una generación explosiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) y en las reacciones de óxido-reducción que pasan por los inones de Cadmio y Plomo en el citoplasma, dejando situaciones nuevas que desencadenen fisiopatías con consecuencia directa en procesos de reparación, replicación y multiplicación de ADN y ARN (Hartwig, 1995).

Cuando se integran ambos metales a los tejidos, se bioacumulan, se bioconcentran y son capaces de reaccionar con moléculas orgánicas y alterarlas, presentando por consiguiente unas estructuras inconvenientes de un metabolismo celular trastornado con la disminución de los grupos sulfhidrilo, de radicales áminos, de fosfatos, de carboxilos, de imidazoles e hidroxilos, por citar algunos cuantos, que son componentes fundamentales en enzimas, proteínas, y ácidos nucleicos.

3.3.7 Conclusiones

Las plantas expuestas a los tóxicos Cd^{2+} y Pb^{2+} en *B. arrecta*, evidenciaron su efecto patógeno inhibiendo crecimiento normal de las raíces, por el daño causado a las paredes celulares de la epidermis, el cortex y la endodermis.

Las concentraciones anómalas probadas en este estudio de $CdCl_2$ y $Pb(NO_3)_2$, de 10 ppm y 500 ppm, respectivamente, produjeron daños irreversibles en el sistema de membranas, alterando por consiguiente la fisiología de *B. arrecta* con deterioro anatómico en hojas, raíces y tallos.

En hojas y tallos fueron evidentes los daños a los cloroplastos por la acción patogénica de ambos metales. Se demostró en las observaciones de ultraestructura que los daños para cada metal son diferentes en compartimentos orgánulos celulares.

4. Recomendaciones

Es importante conducir otros estudios similares a éste, en donde se relacionen otros daños por metales pesados diferentes a Cd^{2+} y Pb^{2+} donde se involucre otros metales pesados u otras especies químicas de los mismos.

Ampliar los inventarios de pasturas a otras zonas de trópico tanto medio como alto, con el fin de precisar determinantes y concurrencias de problemas de metales pesados en estos productores primarios.

Determinar gradientes de contaminación por estratos en las raíces, con el fin de homogenizar las condiciones donde posiblemente ocurra la mayor bioacumulación, la mayor bioconcentración y los blancos de expresión de fisiopatías en las raíces.

Relacionar otras variables fisiológicas como tasas fotosintéticas y transpiración con diferentes niveles de bioacumulación por Cd y Pb.

Es importante complementar estos estudios con investigaciones que relacionen los efectos genotóxicos de Pb y Cd en los cromosomas de diferentes grupos celulares.

Utilizar técnicas de biología molecular con estas especies de *Brachiaria* con el fin de explorar genes marcadores sobre capacidad fitorremediadora con fines de limpiar suelos en grandes extensiones, pero que no se utilicen para la alimentación animal.

A. Anexo: ANAVAS variables morfológicas en la fase de invernadero.

ANALISIS DE VARIANZA METALES PESADOS INVERNADERO

Procedimiento GLM

Información de nivel de clase		
Clase	Niveles	Valores
REP	4	1 2 3 4
PLAN	6	1 2 3 4 5 6
METAL	7	Cd1 Cd1xPb1 Cd2 Cd2xPb2 Pb1 Pb2 testigo

Número de observaciones leídas 168

Número de observaciones usadas 168

Variable dependiente: Peso fresco

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
REP	3	24.603988	8.201329	1.31	0.2731
PLAN	5	37.514107	7.502821	1.20	0.3124
REP*PLAN	15	55.377083	3.691806	0.59	0.8784
METAL	6	5462.993690	910.498948	145.62	<.0001***
Error	138	862.837738	6.252447		
Total corregido	167	6443.326607			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	PFRESCO Media
0.866088	20.46885	2.500489	12.21607

Variable dependiente: Peso Seco

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
REP	3	0.18440476	0.06146825	3.31	0.0220*
PLAN	5	0.08274048	0.01654810	0.89	0.4888
REP*PLAN	15	0.24307381	0.01620492	0.87	0.5955
METAL	6	18.69073929	3.11512321	167.80	<.0001***
Error	138	2.56188929	0.01856442		
Total corregido	167	21.76284762			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	PSECO Media
0.882282	27.10826	0.136251	0.502619

ANALISIS DE VARIANZA METALES PESADOS INVERNADERO

Procedimiento GLM

Variable dependiente: Raíz fresca

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
REP	3	0.16047619	0.05349206	0.78	0.5081
PLAN	5	0.63547619	0.12709524	1.85	0.1073
REP*PLAN	15	0.39738095	0.02649206	0.39	0.9810
METAL	6	32.54476190	5.42412698	78.90	<.0001***
Error	138	9.48666667	0.06874396		
Total corregido	167	43.22476190			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	RAIZFRES	Media
0.780527	17.59107	0.262191		1.490476

Variable dependiente: Raíz seca

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
REP	3	0.02643026	0.00881009	1.51	0.2153
PLAN	5	0.02270827	0.00454165	0.78	0.5677
REP*PLAN	15	0.09498099	0.00633207	1.08	0.3770
METAL	6	1.87710123	0.31285020	53.54	<.0001***
Error	138	0.80634877	0.00584311		
Total corregido	167	2.82756952			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	RAIZSEC	Media
0.714826	45.96427	0.076440		0.166304

ANALISIS DE VARIANZA METALES PESADOS INVERNADERO

Procedimiento GLM

Variable dependiente: Longitud raíz

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
REP	3	51.905000	17.301667	2.59	0.0555
PLAN	5	7.116905	1.423381	0.21	0.9566
REP*PLAN	15	43.480714	2.898714	0.43	0.9666
METAL	6	2446.093095	407.682183	60.98	<.0001***
Error	138	922.584048	6.685392		
Total corregido	167	3471.179762			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	LONRAIZ	Media
0.734216	24.05487	2.585612		10.74881

Variable dependiente: Longitud planta

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
REP	3	192.07654	64.02551	1.52	0.2108
PLAN	5	330.49383	66.09877	1.57	0.1713
REP*PLAN	15	447.49817	29.83321	0.71	0.7706
METAL	6	23811.89608	3968.64935	94.53	<.0001***
Error	138	5793.82758	41.98426		
Total corregido	167	30575.79220			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	LONTOTAL	Media
0.810509	12.59625	6.479526		51.44012

ANALISIS DE VARIANZA METALES PESADOS INVERNADERO

Procedimiento GLM

Variable dependiente: Área Foliar

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
REP	3	821.1040	273.7013	2.79	0.0427*
PLAN	5	163.0784	32.6157	0.33	0.8923
REP*PLAN	15	525.6464	35.0431	0.36	0.9869
METAL	6	179152.6566	29858.7761	304.80	<.0001***
Error	138	13518.7666	97.9621		

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
REP	3	821.1040	273.7013	2.79	0.0427*
PLAN	5	163.0784	32.6157	0.33	0.8923
REP*PLAN	15	525.6464	35.0431	0.36	0.9869
Total corregido	167	194181.2520			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	ARFOL Media
0.930381	8.618318	9.897579	114.8435

Variable dependiente: Diámetro raíz

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
REP	3	0.00208333	0.00069444	0.44	0.7277
PLAN	5	0.03672619	0.00734524	4.61	0.0006**
REP*PLAN	15	0.01255952	0.00083730	0.53	0.9229
METAL	6	0.35154762	0.05859127	36.77	<.0001***
Error	138	0.21988095	0.00159334		
Total corregido	167	0.62279762			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	DIAMRAIZ Media
0.646946	12.03950	0.039917	0.331548

ANALISIS DE VARIANZA METALES PESADOS INVERNADERO

Procedimiento GLM

Variable dependiente: Volumen raíz

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
REP	3	2.042143	0.680714	0.26	0.8545
PLAN	5	39.301429	7.860286	3.00	0.0134
REP*PLAN	15	24.308571	1.620571	0.62	0.8566
METAL	6	2982.389048	497.064841	189.48	<.0001***
Error	138	362.019524	2.623330		
Total corregido	167	3410.060714			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	VOLRAIZ Media
0.893838	9.422554	1.619670	17.18929

Variable dependiente: Presión hídrica

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
REP	3	0.03408274	0.01136091	0.66	0.5797
PLAN	5	0.12936964	0.02587393	1.50	0.1947
REP*PLAN	15	0.17759940	0.01183996	0.69	0.7958
METAL	6	5.79389524	0.96564921	55.87	<.0001***
Error	138	2.38501905	0.01728275		
Total corregido	167	8.51996607			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	PHIDRICO Media
0.720067	-29.27227	0.131464	-0.449107

B. Anexo: Prueba de Múltiples rangos de Bonferroni para la variable (Peso fresco planta en gramos) dopada, con las diferentes concentraciones de Cadmio y Plomo

Método: 95,0 porcentaje Bonferroni

<i>Concentración del metal</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Pb alto	24	5,17917 a	X
Cd medio x Pb medio	24	8,16667 b	X
Cd alto	24	8,50417 b	X
Cd alto x Pb alto	24	9,6625 b	X
Pb medio	24	14,5292 c	X
Cd medio	24	16,3458 c	X
Testigo	24	23,125 e	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

C. Pruebas de Múltiple rangos de Bonferroni para la variable (peso seca planta en gramos) dopada con las diferentes concentraciones de Cadmio y Plomo

Método: 95,0 porcentaje Bonferroni

<i>Concentración del metal</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Cd alto x Pb alto	24	0,208333 a	X
Pb alto	24	0,241667 a	X
Cd medio x Pb medio	24	0,2625 a	X
Cd alto	24	0,295833 a	X
Pb medio	24	0,6125 b	X
Cd medio	24	0,745833 c	X
Testigo	24	1,18333 d	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

D. Pruebas de Múltiple Rangos de Bonferroni para la variable (peso fresco raíz en gramos) dopada, con los diferentes concentraciones de Cadmio y Plomo

Método: 95,0 porcentaje Bonferroni

<i>Concentración metal</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Cd alto	24	0,70 a	X
Pb medio	24	1,30833 b	X
Cd medio x Pb medio	24	1,42083 bc	XX
Cd alto x Pb alto	24	1,49167 bc	XX
Cd medio	24	1,56667 c	X
Pb alto	24	1,6125 c	X
Testigo	24	2,3125 d	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

E. Pruebas de Múltiple Rangos de Bonferroni para la variable (peso seco raíces en gramos) dopada, con los diferentes concentraciones de Cadmio y Plomo

Método: 95,0 porcentaje Bonferroni

<i>Concentración metal</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Pb alto	24	0,0458333 a	X
Cd alto x Pb alto	24	0,0875 ab	XX
Cd medio x Pb medio	24	0,120833 b	X
Cd alto	24	0,133333 b	X
Pb medio	24	0,15 b	X
Cd medio	24	0,258333 c	X
Testigo	24	0,370833 d	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

F. Pruebas de Múltiple Rangos de Bonferroni para la variable (longitud de raíces en centímetros) dopada, con los diferentes concentraciones de Cadmio y Plomo.

Método: 95,0 porcentaje Bonferroni

<i>Concentración del metal</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Cd alto x Pb alto	24	4,6375 a	X
Cd medio x Pb medio	24	6,54167 a	X
Cd alto	24	10,2792 b	X
Pb alto	24	11,1375 b	X
Pb medio	24	12,1083 bc	XX
Cd medio	24	13,8917c	X
Testigo	24	16,6458 d	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's

G. Pruebas de Múltiple Rangos de Bonferroni para la variable (longitud total planta en centímetros) dopada, con los diferentes concentraciones de Cadmio y Plomo.

Método: 95,0 porcentaje Bonferroni

<i>nivel metal</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Cd alto	24	33,025 a	X
Cd medio x Pb medio	24	39,7958 b	X
Pb alto	24	50,3458c	X
Cd medio	24	50,6042 cd	XX
Cd alto x Pb alto	24	56,3708 de	XX
Pb medio	24	57,0625 e	X
Testigo	24	72,8792 f	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

H. Pruebas de Múltiple Rangos de Bonferroni para la variable (diámetro de raíces en mm) dopada, con los diferentes concentraciones de Cadmio y Plomo.

Método: 95,0 porcentaje Bonferroni

<i>Concentración del metal</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Cd alto	24	0,279167 a	X
Cd medio x Pb medio	24	0,3125 ab	XX
Pb medio	24	0,316667 ab	XX
Cd alto x Pb alto	24	0,341667 b	X
Cd medio	24	0,358333 bc	XX
Pb alto	24	0,4 cd	XX
Testigo	24	0,441667d	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

I. Pruebas de Múltiple Rangos de Bonferroni para la variable (volumen de raíces) dopada, con los diferentes concentraciones de Cadmio y Plomo.

Método: 95,0 porcentaje Bonferroni

<i>Concentración del metal</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Cd alto x Pb alto	24	10,0833 a	X
Cd medio x Pb medio	24	14,5417 b	X
Pb alto	24	16,5 c	X
Cd alto	24	16,5833 c	X
Cd medio	24	18,875 d	X
Pb medio	24	19,3333 d	X
Testigo	24	24,8333 e	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Bibliografía

Abollino, O.; Aceto, M.; Malandrino, M.; Mentasti, E.; Sarzanini, C.; Barberis, R. 2002. Distribution and mobility of metals in contaminated sites. Chemometric Investigation Pollutant Profiles. Environ. Pollut. 119:177-193.

Adamo, P.; Dudka, S., Wilson, M.J.; Mchardy, W.J.(2002). Distribution of trace elements in soils from the Sudbury smelting area (Ontario, Canada). Water Air Soil Pollut. 137, 95-116

ALAM. (1974). Revista de la Asociación Latinoamericana de Malezas. Resumen del Panel Sobre Métodos para la Evaluación de Ensayos en Control de Malezas en Latinoamérica. En Congreso de ALAM. Cali, Colombia. P. 6 - 12.

Alam, M.; Snow, E.; Tanaka, A. (2003). Arsenic and heavy metal Contamination of vegetables Grown In Samta Village, Bangladesh. The Science of the Total Environment 308 83–96.

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. Y Watson, J. D. (1996). Biología molecular de la célula, 3 Ed. Omega. Biblioteca: 576.3alb P.179 84, 317 8.

Alcocer V. M.; Castellano, A.; Herrera, F.; Chel L. Y Betancur D. (2007). Detección de metales pesados y dicloro difenil triclor etano en músculos y órganos de bovinos. En: Yucatan. Tec Pecu Mex; 45(2): 237-247

Alloway, B. J. (1995). Heavy metals in soils. Eds John Wiley and Sons, Inc. New York. 368pp.

A.L.S.A. (2011). Análisis Foliares, Laboratorios A-L De México, S.A. De C.V.

Andaluz S, López-Millán A-F, De Las Rivas J, Aro E-M, Abadía J, Abadía A. (2006). Proteomic profiles of thylakoid membranes and changes in response to iron deficiency. *Photosynthesis Research* 89: 141-155.

Angelova, V.; K. Ivanov and R. Ivanova. (2004). Effect of chemical forms of lead, cadmium, and zinc in polluted soils on their uptake by tobacco. *Journal of Plant Nutrition*. Vol. 27, No. 5, Pp. 757–773, 2004.

Anon. (1980). Muestreo de pastos. Taller IV Seminario Científico De La Eepf “Indio Hatuey”. Matanzas. Cuba.

Arambasic, M.B.; S. Bjelic, and G. Subakov. (1995). Acute toxicity of heavy metals (copper, lead, zinc), phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidium sativum* L., and *Daphnia magna* St., Comparative Investigations and The Practical Applications. *Water Res.* 29:497-503.

Arkhipchuk, V.V.; M.V. Malinovskaya, and N.N. Garanko. (2000). Cytogenetic study of organic and inorganic toxic substances on *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, and *Hydra attenuata* Cells. *Environ. Toxicol.* 15:338-344.

Arroyave Q, Catalina., Araque M., Pedronel, y Carlos A. Peláez J. (2010). Evaluación de la bioacumulación y toxicidad de cadmio y mercurio en Pasto Llanero (*Brachiaria Dictyoneura*). *Vitae*. Volumen. 17. Numero 1.

Avellaneda, A. (1998). Petróleo, Colonización y Medio Ambiente en Colombia. De la Tora a Cusiana, ECOE Ediciones, Bogotá.

Azcón-Bieto, J & Talón, M. (2000). Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mcgraw-Hill Interamericana. 1ra Ed. Barcelona, España. 522p. 481-496 Pp.

Baker A.J.M., McGrath S.P., Reeves R.D., Smith J.A.C. (2000). Metal hyperaccumulator plants: A Review of Ecology and Physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry N *et al.*, Editors. Phytoremediation of contaminated soil and water. Boca Raton, L: Lewis Publishers. P. 129-158

Baker, A. J. M. & Walter, P. L. (1990). Ecophysiology of Metal Uptake by tolerant plants. En: Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary Aspects (A. J. Shaw, Ed.). Crc Press Inc., Boca Raton, Fl, Pp. 155-157.

Baker, A. J. M. (1981). Accumulators and Excluders Strategies in the response of plants to heavy metals. Journal Of Plant Nutrition. 3: 643-654

Baldomero G. & Mármol, J.F. (2002). Los pastos y la intensificación racional de la ganadería de doble propósito. Asociación venezolana de producción animal. Impreso en Ediciones Astro Data S.A. Valera Edo. Trujillo, 25 De Octubre De 2002.

Balestrasse, K.B., Gallego, S.M., Tomaro, M.L. 2004. Cadmium-induced senescence in nodules of soybean (*Glycine Max L.*) plants. Plant Soil 262:373-381.

Barceló J, & Poschenrieder C. (2002). Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a Review. Environ Exper Bot; 48 (1): 75-92.

Basurto S, A.; Núñez B, R.; Pérez L, Hernández R, O. (2009). Fisiología del estrés ambiental en plantas. Revista Synthesis. No. 48, paginas 1-5

Battke F, Ernst D, Fleischmann F. (2008). Halbach s. phytoreduction and volatilization of mercury by ascorbate in *Arabidopsis thaliana*, European Beech and Norway Spruce. Appl Geochem; 23 (3): 494-5026.

Beyersmann D. & Hartwig A. (2008). Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. Archives of Toxicology. Volume 82, Issue 8, pp 493-512

Bazzaz, F.A.; Rolfe, G.L.; Windle, P. (1974). Differing sensitivity of corn and soybean photosynthesis and transpiration to lead contamination. J. Environ. Qual. 3: 156-158.

Bauhaus, J. Messier, Ch. P. I (1999). Descriptores: análisis de imagen. Rhizo image. Pruebas de laboratorio raíz. Imprenta: 1999: 91(1): 142-147.

Becerril, J. M., Barrutia O., García Plazaola J. I., Hernández A., Olano J. M., Garbisu C. (2007). Especies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación. Revista Ecosistemas. 2007/2. España.

Bergmann, W. (1992). Nutricional disorders of plants – development, visual and analytical diagnosis. Jena: Fisher Verlag.

Benavides, M.A.: “Ecofisiología y Química del Estrés en Plantas”, departamento de agricultura/Uaaan, 2002.

Benavides, M.P.; Gallego, S.M., Tomaro, M. (2005). Cadmium toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology 17:21-34.

Bernal E., J. (2009). Seminario actualidades sobre pastos y forrajes. Librería y periódico. El Agro. 19 Y 20 De Septiembre.

Bernard A. (2008). Biomarkers of metal toxicity in population studies: research potential and interpretation issues. J. Toxicol. Environ. Health A. 71, 1259-1265

Bhopal, R. (2008). Concepts of epidemiology. Integrating the ideas, theories, principles and methods of epidemiology (2nd Edition). New York: Oxford University Press; 2008. ISBN 978-0-19-954314-

Blum, A. (1998). Plan breeding for estrés environments, Boca Raton Florida, CRP PRES INC., 1988. P.223.

Blaylock, M.J.; Salt, De.; Dushenkov, S.; Zakarova, O.; Gussman, C.; Kapulnik, Y.; Ensley, B.D.; Raskin, I. (1997). Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. Environ. Sci. Technol. 31: 860-865.

Bolivar, V. (1999). "Características químicas de un suelo ácido y composición mineral de *brachiaria humidicola* bajo un sistema silvopastoril con *Acacia Mangium*. En el Trópico Húmedo" En: Memorias VI Seminario Internacional sobre sistemas agropecuarios sostenibles.

Borgues, J.; Barrios, M.; Sandoval, E. Millán, K; Sánchez, D. Bastardo, Y.; Márquez, O. (2012). Aspectos agronómicos y productivos de *Brachiaria Humidicola* (Rendle), En el Estado Yaracuy. Mundo Pecuario, VIII, Nº 2, 132-138.

Botero, R. (1998). Manejo de explotaciones ganaderas en las sabanas bien drenada de Los Llanos Orientales de Colombia. Cali. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). P: 34.

Boularbah A., Schwartz C., Bitton G., Abouddrar W., Ouhammou A. y Louis Morel J. (2006). Heavy metal contamination from mining sites In South Morocco; 2. Assessment of Metal Accumulation and Toxicity in Plants. Chemosphere, 63, 811-817

Bowie, S.H.U. & Thurston (1985). Environmental geochemistr y and health. Kluwer Academic Publ., Hingham. Ma

Brady, N & Weil, R. (2002). Soil acidity: calcium and magnesium as plant nutrients cap 9:11 Pg. 404-410.

Brady, C & Weil R, R. (2008). The nature and properties of soil. Edition: Hardcover. Prentice Hall. 990 P.

Brooks R.R. (1998). Plants that hyperaccumulate heavy metals. Wallingford, UK: Cab.

Brown, C., Hock, W. (1988). Pesticide education manual- a guide to safe use and Handling. The Pennsylvania State University, University Park, PA.

Burton, K.; Morgan, E. Roig, A. (1984). The influence of heavy metal son growth of sitka-spruce In South Wales Forest. Li Green House Experiments. Plant Soil. 78: 271-282.

Bustamante, J.; Chaparro, A; Peláez, M; Hernandez, W; Ardila L; Cardona, Y; Garcia, C. (2011). utilidad de la microscopia electrónica, en estudios de bioacumulación de sustancias xenobióticas, en los seres vivos. Boletín Técnico Agrotecnia Año 2 – Número 9 – Junio.

Caballero, J.; Rubio, M.; Martin, R.; Revert, C. (2002). Exposición dietética a metales pesados tóxicos (Hg, Pb y Cd) En Canarias. V Congreso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria y III Congreso Iberoamericano de Nutrición y Salud Pública (Madrid, 26-29 Septiembre de 2002).

Canchila, E.R.; Mildrey, F.; Ojeda, R.; Machado, y.; Canchila, N. (2010). Dinámica de crecimiento de 24 accesiones de *Brachiaria spp.* Pastos y Forrajes V.33 N.4 Matanzas Oct.-Dic.

Canchila, E.R.; Mildrey, H. B. Wencomo, F. Ojeda, H. Mateus, E. Romero, G. Argüello, R. Ruiz Y, Neydi Canchila. (2011). comportamiento agronómico de siete accesiones de *brachiaria humidicola* durante la fase de establecimiento. Pastos y Forrajes Vol.34 No.2

Cárdenas O, Galindo P (2004). Biplot Con información externa basado en modelos bilineales generalizados. Consejo de desarrollo científico y humanístico. Universidad Central de Venezuela. 251 Pp.

Cardellá, R. (2000). Componentes celulares y genética molecular. En bioquímica Médica. La Habana: Editorial de Ciencia y Técnica. 549 – 557.

Cardona. C.; Sotelo. G & Miles J.W. (2006). Resistencia en *Brachiaria* a especies de Salivazo: Métodos, Mecanismos y Avances. *Pasturas Tropicales*. 26(3):30

Carrascal, M., Cano, M., Ramos, V., Y Arenas, C. (2005). Contenidos En As, Cd, Pb, Cu Y Zn en músculo e hígado de liebres (*Lepus Europaea*) capturadas en el corredor verde del Guardiamar. *Revista de Toxicología*. 22(1):19-25.

Carrasco R, A.; León S, O.; Acevedo, E. (2005). Metales pesados y biodisponibilidad. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Casilla 1004, Santiago, Chile.

Carrillo-González R., Y González-Chávez M.C.A. (2006). Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. *Environ. Pollut.* 144, 84-92.

Carrillo-González R. (2005). Niveles de contaminación de los suelos y las plantas. En: el sistema planta-micro-organismo-suelo en áreas contaminadas con residuos de minas (M. C. González-Chávez, J. Pérez-Moreno, Y R. Carrillo-González, Ed.). Colegio De Postgraduados. Montecillo, Estado De México. Pp. 34-60.

Casado J.; Selle, S.; Días, C. Navarro, J. Mataix, B.; Gómez, I. (2007). Effect of composted sewage sludge application to soil on sweet pepper crop (*Capsicum Annuum Var. Annuum*) Grown under two exploitation regimes. *Anagement*, 27:1509–1518.

Casirra, F. (2011). Evaluación de estrés por metales pesados en material vegetal. Comunicación Personal. Uptc.

Casierra P, F. (2001). Fundamentos fisiológicos, bioquímicos y antomicos del estrés por aluminio en vegetales. *Revista comalfi*, volumen xxviii, no. 2. Mayo –agosto Pag 9.

Casierra, F. & O. Aguilar. (2007). Estrés por aluminio en las plantas: reacciones en el suelo, síntomas en vegetales y posibilidades de corrección. *Rev. Col. C. Hort.* 1(2), 246 -256.

Casierra, F. & J. Cárdenas. (2009). Growth of maize seedlings (zea mays l. Var. Porva) in nutrient solution with low (Ca + Mg + K)/Al Ratio. Rev. Udca Actual Divulg. Cient. 12(2), 91-100.

Catasus, L. (1997). Manual de Agrostología. Ed. Academia. La Habana, Cuba. 98 Pp.

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). (2002). Red Colombiana para la Evaluación de Brachiarias. Resumen de Logros. 1995-2000. Convenio Fondo Nacional del Ganado. (Fedegan). 12 P.

Chisholm St, Coaker G, and Day B, Staskawicz Bj (2006) Host-Microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. Cell 124: 803–814.

CIAT. Informe Anual Del Ciat 2006-2007. 72 P. 2007.

Clemens S, Palmgren Mg, Krämer Pa. (2002). Long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. Trends Plant Sci.7: 309-315

Cobb, G.; Sands, K.; Waters, M.; Wixson, M.; Dorward, E. (2000). Accumulation of heavy metals by vegetables grown in mine wastes. Environmental Toxicology and Chemistry Volume 19, Issue 3, Pages 600–607.

Convenio de Colaboración de Ecopetrol-Comite de Gremios-Unipaz. (2004). Proyecto “Puesta en Marcha del Censo Empresarial y Diagnostico Rural para los corregimientos aledaños a Barrancabermeja”. Barrancabermeja.

Cornejo, O. (2002). Factores ambientales que originan el estrés. Ecofisiología y química del estrés en plantas”, Departamento de Agricultura/ UAAAN, 2002.

Cuesta, F.; F. Baquero, A.; Ganzenmuller, B; Rivera.; M. Sáenz, G. Riofrío, M. L. Larrea, R. Cisneros Y K. Beltrán. (2005a). Evaluación ecorregional de los páramos y bosques montanos de la cordillera real oriental: componente terrestre. ECOCIENCIA, The Nature Conservancy. Quito-Ecuador

Cuesta, F., A. Ganzenmuller, F. Baquero, S. Benítez, O. Hernández Y R. Polanco. (2005b). Análisis de viabilidad e integridad ecológica de los objetos de conservación. ECOCIENCIA, The Nature Conservancy, Quito – Ecuador.

Cuesta, F., A. Ganzenmuller, F. Baquero, S. Benítez, O. Hernández Y R. Polanco. (2005c). Análisis de viabilidad e integridad ecológica de los objetos de conservación. ECOCIENCIA, The Nature Conservancy, Quito – Ecuador.

Cuesta, M., Vales I, Gomez-Pando L, Orjeda G, Wise R, Sato K, Hori K, Capettini F, Vivar H, Chen X, Hayes P. (2006). Mapping multiple disease resistance genes using a barley mapping population evaluated In Peru, Mexico, and The USA. *Mol. Breed.* 18: 355-366.

Chwil, M. (2005). The influence of lead on structure of *Cucumis Sativus* L. Leaves *Folia Horticulturae Ann.* 17/2, 2005, 11-22

Danon A, Gallois P. (1998). Uv-C Radiation Induces Apoptotic-Like Changes In *Arabidopsis Thaliana*. *Febs Lett.* 437: 131-136.

Davies, B.E. (1995). Lead and other heavy metals in urban areas and consequences for the health of their inhabitants. In: Majumdar, S.K., Miller, E.W., Brenner, F.J. (EDS), *Environmental Contaminants, Ecosystems and Human Health*, Pp. 287-307. The Pennsylvania Academy Of Science, Easton PA, USA.

Doce .(2001). Reglamento CE 466/2001 de la Comisión por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Doce, 16 Mmrzo 2001 L77/1-13.

Dovgaliuk, A., Kaliniak, T., Y Blium, I. (2001). Cytogenetic effects of toxic metal salts on apical meristem cells of *Allium Cepa* L. Seed Roots. *Toxicology Genetic*. 35(2):3-10.

Dreher, K. (2013). The hazards of playing it safe: perspectives on how the society of toxicology should contribute to discussions on timely issues of human and environmental safety. *Toxicol. Sci.* (2013) 136 (1): 1-3 first published online September 5, 201.

Encuesta Nacional Agropecuaria. ENA (2004). Inventario ganadero bovino. Republica de Colombia, Fuente: ENA, DANE - Proyecto Sisac y Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural ENA.

Estrada A, J. (2002). Pastos y forrajes para el trópico colombiano. Universidad De Caldas. 499 P.

Espinoza F, S.; Pessino, C.; Quarín, Valle, E. (2002). Effect of pollination timing in the rate of apomictic reproduction revealed by rapid markers. *Annals of Botany*, 89:165-170.

Esquivel, H. (2007). Tree resources in traditional silvopastoral systems and their impact on productivity and nutritive value of pastures in the dry tropics of Costa Rica. Ph. D. Thesis. Catie, Turrialba, Costa Rica.

Falcó, G.; Llobet, J.; Bocio, A., Domingo, L. (2006). Daily Intake of Arsenic, Cadmium, Mercury, and Lead by Consumption of Edible Marine Species. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54 (16), pp 6106–6112.

FAO. (1993). Food and agriculture organization of the United Nations world health organization. Codex classification of foods and animal Feeds. Joint Fao/Who Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission Codex Alimentarius Pesticides Residues In Food, Volumen 2. 183 P.

Falcone Fh, Pritchard Di (2005). «Parasite role reversal: worms on trial». Trends Parasitol. 21 (4): Pp. 157–60

Fang, C., Wang, Y., Jiang, S., Y Zhu, H. (2001). Study on the genotoxicity of dibromoacetic acid in drinking water. Mutagenecity Research. 30(5):266-269.

Ferrat L, Pergent-Martini C, Romeo M. (2003). Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. Aq. Tox. 65: 187-204.

Ferrufino, A. & Vallejo, A. (1986). Evaluación de ecotipos de *Brachiaria* en el Chapare, Bolivia. Pasturas Tropicales. 8(3):23

Fitzgerald, E, J.; Caffreyb, Jm.; Nesaratnamc, St.; Mcloughlina, P. (2003). Copper and lead concentrations in salt marsh plants on the suir estuary, Ireland. Environmental Pollution.

Fusconia A, Repetto O, Bona E, Massa N, Gallo C, Dumas-Gaudot E, *et al.* Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv Frisson seedlings. Environ Exp Botany. 2006; 58:253-60.

García V, D. (2006). Efectos fisiológicos y compartimentación radical en plantas de *zea mays* l. expuestas a la toxicidad por plomo. Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas. Universidad Autonoma De Barcelona. 131 P.

García I. & Dorronsoro, C. (2005). Contaminación por metales pesados. En tecnología de suelos. Universidad de Granada. Departamento de edafología y química agrícola.

García, B., García, G., Rojo, D., Y Sánchez, G. (2001). Plantas con propiedades antioxidantes. Rev. Cubana. Invest. Biomed. 20(3):231-5.

García, E.; Hernández; E.; García N, E.; Acevedo, O. (2011). Contenido y traslocación de plomo en avena (*Avena sativa*, L.) y Haba (*Vicia faba*, L.) de un suelo contaminado. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 17(1): 5-118, 2011.

Garbisu, C., Y Alkorta, I. (2001). Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology*. 77:229-236.

Gaston, K & Spicer, J. (2004). *Introducción a la biodiversidad*, (United Kingdom: Blackwell, 2004) págs. 3-4.

Gianazza E, Wait R, Sozzi A, Regondi S, Saco D, Labra M, Agradi E. (2007). Growth and protein profile changes in *Lepidium Sativum* L. Plantlets Exposed to cadmium. *Env. Exp. Bot.* 59: 179-187.

Girroti, AW. (1990). Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem. Photobiol.* 51: 497-509.

Gómez B, J.; Santana C, J.; Romero M, F.; Armienta H, M., Morton B, O. Y Ruiz H, E. (2010). Plantas de sitios contaminados con desechos mineros en Taxco, Guerrero, México. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 87, 131-133.

Grill, E.; Winnacker, El.; Zenk, Mh. (1987). Phytochelatins, a class of heavy metals Binding peptides of plants are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 84: 439–443.

Grispen, V; Nelissen, H. Verkleij, J. (2006). Phytoextraction With *Brassica napus* L. A tool for sustainable management of heavy metals contaminated soils. *Environ Pollut.* 144 (1):77-83.

Grover, I & Kaus, Y. 1999. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutatgenecity Research.* 426(2):183-188.

Gupta, D.; Huang, H.; Corpas, F. 2013. Lead tolerance in plants: strategies for phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*. 2013. Volume 20, Issue 4, Pp 2150-2161.

Gunsé, B.; Poschenreider, Ch.; Barceló, J. (1997). Water transport properties of roots and root cortical cells in proton-and al-stressed maize varieties. *Plant Physiol*. 113: 595–602.

Gutiérrez, C.; Martín, A.; Revert, R.; Lozano, C.; Hardisson, A. (2004). El plomo como contaminante alimentario. *Revista Toxicológica* No. 21: 72-80.

Halffter, G., J. Soberón, P. Koleff Y A. Melic (Eds.). (2005). Sobre diversidad biológica: el significado de las diversidades alfa, beta y gamma. *Monografías Tercer Milenio*, Sociedad Entomológica Aragonesa, Zaragoza.

Halliwell D, Turoczy N, Stagnitti F (2000). Lead concentrations in eucalyptus sp. in a small Coastal Town. *Bull Environ Contam Toxicol* 65: 583-590.

Hartwig, A. (1995). Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals*. 8: 3-11.

Hedaya, A. K. (2008). Lead accumulation and its effect on photosynthesis and free amino acids in vicia faba grown hydroponically. *Australian J. Basic Appl. Sci.* 2 (3): 438-446.

Hernández, W. (1997). Aspectos clínico-patológicos en bovinos que pastorean en zonas con altos índices de molibdeno en el Magdalena Medio Colombiano". En: Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* (1997). Issn: 0120-0690 Ed: Editorial Universidad de Antioquia V.10 Fasc. P.87 - 87.

Hernández, A. J.; Alexis, S.; Fernández-Pascual, M. y Pastor, J. (2006). Estudio de la nutrición mineral de *Phaseolus vulgaris* L. En suelos de cultivo que contienen metales pesados. En *Nutrición Mineral: Aspectos fisiológicos, agronómicos y ambientales*. C. Lamsfus (editora –coordinadora): 573-580. Universidad Pública de Navarra.

Hernández, A. J. & Pastor, J. (2008-a). Relationships between plant biodiversity and heavy

Metals bioavailability in grassland overlying an abandoned mine. *Enviro Geochemical Health*, 30: 127-133

Hernández, A. J. & Pastor, J. 2008-b). Validated approaches to restoring the health of Ecosystems affected by soil pollution. In *Soil Contamination Research Trens*: 51-72. Nova Science Publishers, New York.

Homan Cs, Brogan Gx, Scott Orava R. (1998). Lead Toxicity. In: *Emergency toxicology*. Second edition. Edited By Peter Viccellio, By Lippincott-Raven Publishers. Pp 363-378.

Holmans, F; Rivas, L; Argel, P; Pérez, E. (2004). Impacto de la adopción de pastos *Brachiaria*: Centroamérica Y México. Cali, Co, Ciat. 32 P.

Iannacone, J. & Alvarino, L. (2005). Efecto ecotoxicológico de tres metales pesados sobre el crecimiento radical de cuatro plantas vasculares. *Agricultura Técnica (Chile)* 65(2):198-203.

IARC International Agency for Research on Cancer. (1993). Heavy metals.

Järup L. (2003). Hazards of heavy metals contamination. *British Medical Bulletin*; 68:167-182.

Jiménez, O.M.M., L. Granados, J. Oliva, J. Quiroz Y M. Barrón. (2010). Calidad nutritiva de *Brachiaria humidicola* con fertilización orgánica e inorgánica en suelos ácidos. *Arch. Zootec.* 59(228): 561-570.

Kabata Pendías A., Pendias H. (2001). Trace elements in soils and plants. CRC PRESS. Inc. Boca Ratón. FI 365.

Kabata Pendías, A. (2004). Soil-Plant Transfer of trace elements: An environmental Issue. *Geoderma* 122: 143-149.

Kapusta P, Szarek-Łukaszewska G, Stefanowicz Am. (2011). Direct and indirect effects of metal contamination on soil biota in a zn-pb post-mining and smelting area (S Poland). *Environmental Pollution*. Jun; 159(6):1516-22.

Kerns, M. R., & J. K. Pataky. (1997). Reactions of sweet corn hybrids with resistance to maize dwarf mosaic. *Plant Disease* 81:472-464.

Koizumi, T.; Shirakura, H.; Kumagai, H.; Tatsumoto, H; Suzuki, T. (1996). Mechanism of cadmium induce cytotoxicity in rat hepatocytes: cadmium induce active oxygen - related permeability changes of the plasma membrane. *Toxicology* 114: 125-134

Korotkov, S., Skuiskii, I.; Giazunov, V. (1998). Cd⁺² effects on respiration and swelling of rat liver mitochondria were modified by monovalent cations. *J. Inorg. Biochem.* 70: 17-23.

Kosobrukhov A., Knyazeva I., Mudrik V., (2004). *Plantago major* plants responses to increase content of lead in soil: growth and photosynthesis. *Plant Growth Regul.* 42(2): 145-151.

Kramer, P. (1983). *Water relations of plants*. N.Y. ACADEMIC PRESS. Cap. 3 Y 9.

Kranz, J. (2002). *Comparative epydemiology of plant diseases*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 199 P.

Krishnamurti, G.S.R.; Cieslinski, G.; Huang, P.M.; Van Pees, K.C.J. 1997. Kinetics of cadmium release from soils as influenced by organic acids: implication in cadmium availability. *Journal of environmental quality*, V.26, P.271-277.

Lamoreaux, R J.; Chaney, Wr. (1978). The effect of cadmium on net photosynthesis, transpiration and dark respiration of excised silver maple leaves. *Physiol. Plant.* 43: 231–236.

Large, C., (1966). Measuring plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 4, 9-28.

Lasat M. (2000). Phytoextraction of metals from contaminated soil: A Review of Plant/Soil/Metal Interaction and Assessment of Pertinent Agronomic Issues. J. Hazard Subst Res 2, 1-25.

Lascano, C. (2002). Pasto Toledo (*Brachiaria brizantha* CIAT-26110). Gramínea de crecimiento vigoroso para intensificar la ganadería colombiana. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia. 18p.

Lauwerys, R & Hoet, P. (2001). Industrial chemical exposure: Guidelines for biological monitoring. 3rd Ed. Boca Raton: Lewis Publishers.

Leung H.; Ye Z, H. y Wong M.H. (2007). Survival Strategies of Plants Associated With Arbuscular Mycorrhizal Fungi On Toxic Mine Tailings. Chemosphere 66, 905-915.

Levêque, C. 1994. Environnement et diversité du vivant. Pocket Sciences, Collection Explora. 127 pp.

Levitt, J. (1980). Response of Plants to Environmental Stresses. Water, Salt and Other Stresses. Vol I. Pp 129 - 186. Academic Press, NY.

Lichtenthaler H. K. (1996). Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. J. Plant. Physiol. 148: 4-14.

Lin, Q.; Chen, Y.X.; Chen, H.M.; Yu, Y.L.; Luo, Y.M.; Wong, M.H. (2003). Chemical behavior of cd in rice rhizosphere. Chemosphere, V.50, P.755-761.

Llugany, R.; Tolrà, C.; Poschrieder, J.; Barceló, J. (2007). Hiperacumulación de metales: ¿una ventaja para la planta y para el hombre? Ecosistemas 16 (2).

Looney, N. (1997). Role of endogenous plant growth substances in regulating fruit tree growth and development In: Tree Fruit Physiology, Washington, Wsu, 1997, Pp. 31-40.

Lozano-Rodríguez, E, Hernández, L.E., Bonay, P., Cárpena-Ruiz, R.O. (1997). Distribution of Cd in shoot, and root tissues of maize and pea plants: physiological distribution. Journal of Experimental Botany 48:123-128.

Maass; & C.B. Do Valle (Eds.) (2002). Brachiaria, biología, agronomía y mejoramiento. CIAT, Cnpgc/Embrapa. Cali, Colombia. Campo Grande, Brasil. P. 58 – 78.

Mac Farlane, G. & Burchettb M. (2002). Toxicity, growth and accumulation relationships of copper, lead and zinc in the grey mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. Marine Environmental Research Volume 54, Issue 1, July 2002, Pages 65-84.

Mc Grath, S.P., Shen, Z.G., Zhao, F.J. (1997). Heavy metals uptake and chemical changes in the rhizosphere of *thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soils. Plant Soil 188, 153-159

Madero, A. & Marrugo, J. (2010). detección de metales pesados en bovinos, En los valles de los rios Sinú y San Jorge, Departamento de Córdoba, Colombia. Rev.Mvz Córdoba 16(1):2391-2401.

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.

Malkowski, E.; Kita, A.; Galas, W.; Karez, W.; Kuperberg, M. (2002). Lead distribution in corn seedling (*Zea Mays* L.) And it's effect on growth and the concentrations of potassium and calcium. Plant And Soil. 37: 69-79.

Mármol, J.F. (2006). Manejo de pastos y forrajes en la ganadería de doble propósito. X seminario de pastos y forrajes. Universidad De Zulia, Venezuela. P. 1

Marschner, H. (1997). Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd Ed. New York: Academic Press. 889 P.

Massol-Deyá, A. and E. Díaz. (2003). Trace elements composition in forage samples from various anthropogenically impacted areas In Puerto Rico. Caribbean Journal Of Science. 39:215–220.

Mastrangelo, S., Tomassetti, M., Carratu, M., Evandri, M., Y Bolle, P. (2006). Quercetin reduces chromosome aberrations induced by atrazine in the *Allium Cepa* Test. Environmental and Molecular Mutagenesis. 47:254-259.

Martínez V, C; Rodríguez L, P.; Torres C. H. (2013). Determinación de metales pesados en diferentes órganos de bovinos en pastoreo en dos localidades del Magdalena medio colombiano. Tesis Médico Veterinario. Universidad De La Paz. 67 P.

McPeck, M. A. (2007). The macroevolutionary consequences of ecological differences among species. Palaeontology 50:111–129.

McPeck, M. A., L. Shen, J. Z. Torrey, and H. Farid. (2008). The tempo and mode of three-dimensional morphological evolution in male reproductive structures. American Naturalist 171:E158–E178.

Medrano, C.; Gutiérrez, W.; Esparza, D.; Montilla, A. Faneite, A. (1997). Evaluación de herbicidas post-emergentes para el control de malezas en soya (*Glycine max* (L.) Merr) En la Planicie de Maracaibo. Rev. Fac. Agron. (Luz). 14: 33-46.

Mercer, E. H. & Birbeck, M. S. C. (1966). Electron Microscopy: A Handbook for Biologists. 2nd edition, p. 85. Oxford: Blackwell.

Micó, C.; Recatalá, L.; Peris, M.; Sánchez, J. (2006). Assessing heavy metal sources in agricultural soils of a European mediterranean area by multivariate analysis. *Chemosphere* 65: 863-872.

Ministerio de Minas y Energía. (2011). Pensamiento estratégico del ministerio, 2010-2019. Misión y visión. (Consultado en Internet, Septiembre De 2011).

Moreno A.M., Pérez L., Cano M.A. Y González J. (1993): Contenido en metales pesados y relación con parámetros edáficos en suelos agrícolas de la comunidad de Madrid. *Ecología* 7: 27-35.

Mussali G, P.; Tovar S, E.; Valverde, M.; Rojas Del C, E. (2013). Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystems. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29 (1) 117-140, 2013.

Nikazar, M.; Afshari, N. (2005). Eliminación de metales pesados Pb(II), Cd(II), Cr(VI)) de disoluciones acuosas por adsorción con residuos sólidos agrícolas (paja y salvado de trigo). En: *Afinidad* LXII, 518, Julio–Agosto.

Norman, G.R. & Streiner, D.L. (2005). *Biostatistics: The Bare Essentials*. Third Edition. Harcourt. 261 P.

Nedelkoska T.V. & Doran P.M. (2000). Characteristics of heavy metal uptake by plant species with potential for phytoremediation and phytomining. *Miner. Eng.* 13, 549–561.

Norma Oficial Mexicana Nom-147-Semarnat/Ssa1-(2004). Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por Arsénico, Berilio, Cadmio, Cromo Hexavalente, Mercurio, Níquel, Plomo, Selenio, Talio y Vanadio. *Diario Oficial de la Federación*, 2 de Marzo De 2007. México.

Noreña, J. (Sf). *Cincuenta Gramíneas de Interés Forrajero En Colombia (En Proceso De Publicación)*.

Norman, G.R. & Streiner, D.L. (2005). Biostatistics: the bare essentials. Third Edition. Harcourt. 261 P.

Olivera, Yuseika, Machado, R. & Del Pozo P.P. (2006). Características Botánicas y Agronómicas de especies forrajeras importantes del género *Brachiaria*. Pastos y Forrajes 29(1):5.

Olivera, Yuseika, Machado, R.; Del Pozo, P.P.; Ramírez, J.; Cepero, Bárbara. (2009). Evaluación agronómica de una asociación de 20 accesiones de *Brachiaria Brizantha* con *Stylosanthes guianensis* CIAT-184. Memorias. VIII Taller Internacional Silvopastoril «Los árboles y arbustos en la ganadería». EEPF «Indio Hatuey». Matanzas, Cuba. [Cd-Rom]. P. 96.

Olivera, Yuseika (2008). Persistencia del pastizal en una colección de *Brachiaria spp.* En un suelo Ácido. Pastos y Forrajes. 31 (4):333

Pastor, J., A.; Gutiérrez, -M: A.; Hernández, A.J. (2007). Effects of two chelating agents (EDTA and DTPA) on the autochthonous vegetation of a soil polluted with Cu, Zn and Cd. Science of the total Environment, 378, 114-118.

Pastor, J y Hernández, A.J. (2009). Acción conjunta de Al y metales pesados del suelo en la nutrición mineral del maíz: bioensayos en microcosmos y reflexiones con fines de fitorremediación. En presente y futuro de la nutrición mineral de las plantas. L. Romero (Coord.): 661-673. Ed. INDEMA, Granada. ISBN: 978-84-89780-10-7

Paivoke, Aea. (2002). Soil lead alters phytase activity and mineral nutrient balance of *Pisum Sativum*. Environm. Exp. Bot. 48: 61–73.

Pandey, N. & Prakash, Ch. (2002). Effect of heavy metals Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage. Ant Science. Volume 163, Issue 4, October Pages 753-758.

Pandey, J. & Pandey, U. (2009). Accumulation of heavy metals in dietary vegetables and cultivated soil horizon in organic farming system in relation to atmospheric deposition in a seasonally dry tropical region of India. *American Journal Of Applied Sciences* 6 (3): 534-542.

Peláez, M. (2013). Escala valorativa de reacciones crecientes de fitotoxicidad con metales pesados en *B. Arrecta*. En Memorias: 12 Th Inter-American Microscopy Congress, Ciasem. Cartagena (Colombia), Septiembre 24, 25, 26,27 Y 28. 2013.

Pielichowska M., Wierzbicka M. (2004). The uptake and localization of cadmium by *biscutella leavigata* a cadmium hyperaccumulator. *Acta Biologica Cracoviensia, Ser. Botanika* 46: 57-63.

Przedpelska E., Wierzbicka M. (2007). *Arabidopsis arenosa* (Brassicaceae) from a lead-zinc waste heap in southern Poland - a plant with high tolerance to heavy metals. *Plant and Soil* 299: 43-53.

Phillips D.J.H. (1997). "The use of biological indicator organisms to monitor traces metal pollution in marine and estuarine environments a review" *Environ. Pollut.* 13: 281-317.

Pinto, A.P., Mota, A.M., De Varennes, A., Pinto, F.C. (2004). Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Science of the total Environment* 326:239-274.

Piola JC, Ezpeleta DC. (1998). Valoración de marcadores de exposición al plomo en diagnostico y vigilancia. *Revista de la sociedad de medicina legal de Rosario, Año 7- Número 7. Diciembre. Pág. 2-4.*

Pitzschke, A.; Fornazi, C.; Hirt, H. (2006). Reactive oxygen species signalling in plants. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8:1757–1764

Pizarro, E. (2005). Especies, arbustivas, gramíneas y leguminosas, para el trópico americano. En: IX seminario de pastos y forrajes, 2005. Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET), Agosto 30 y 31.

Pizarro, E. A.; Carvalho, M. A. y Ramos, A. K. B. (1996). En: Pizarro, E. A. y Coradin, L. (Eds.). Potencial del género *Cratylia* como leguminosa forrajera. Memorias del taller de trabajo sobre *Cratylia*. Centro Internacional de Agricultura Tropical-Ciat. Cali, Colombia. Documento de trabajo No. 158. P. 40-49.

Poland J A, Nelson R J. 2011. In The Eye of Beholder: The Effect of Rater Variability and Different Rating Scales On Qtl Mapping. *Phytopathology* 101: 290-298.

Pollard, T.D., Earnshaw, W.C., Lippincott-Schwartz, J. (2008). *Cell Biology*. Saunders, Elsevier (2ª Edición). Philadelphia. A mechanism for the accumulation and retention of heavy metals in tidal freshwater marshes of the upper Delaware River estuary.

Porta, M. (2008). *A dictionary of epidemiology (5th Edition)*. New York: Oxford University Press; ISBN 978-0-19-531450-2

Portela, J.N. (2010). Intensidade e frequência de desfolhação como definidores da estrutura do dossel, da morfogênese e do valor nutritivo da *Brachiaria decumbens* Stapf. Cv. Basilisk Sob lotação intermitente. Tese de Doutorado. Escola Superior

Poschenrieder C. & J. Barceló. (2004). Estrés por metales pesados. Pp. 413–442. En:

Prieto-García, F.; Callejas, H.J.; Lechuga, M.A.; Gaytán J.C.; y Barrado E.E. (2005). Acumulación en tejidos vegetales de arsénico provenientes de aguas y suelos de Zimapán Estado De Hidalgo, México. *Bioagro* 17, 129-135.

Puga, S.; Sosa, M.; Lebgue, T.; Quintana.; Campos, A. (2006). Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera. *Ecología Aplicada*, Vol. 5 N° 1 Y 2, Pp. 149-155.

Quartacci, M. F., Irtelli, B., Gonnell, I C., Gabbrielli, R. and Navari-Izzo, F. (2009). Naturally-assisted metal phytoextraction by *brassica carinata*: role of root exudates environmental pollution. 157:2697–2703.

Rao, I. M.; Kerridge, P. C.; Y Macedo, M. C. (1998). Requerimientos nutricionales y adaptación a los suelos ácidos de especies de *Brachiaria*. En: J. W. Miles; B. L.

Rao IM; Zeigler RS; Vera R; Sarkarung S. (1993). Selection and breeding for acid-soil tolerance in crops: Upland rice and tropical forages as case studies. *BioScience* 43:454–465.

Rao IM; Barrios E; Amézquita E; Friesen DK; Thomas R; Oberson A; Singh BR. (2004). Soil phosphorus dynamics, acquisition and cycling in crop-pasture-fallow systems in low fertility tropical soils of Latin America. En: Delve RJ; Probert ME, eds. *Modelling nutrient management in tropical cropping systems*. ACIAR Proceedings No. 114. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), Canberra, Australia. P 126–134.

Raskin, I., Smith, R.D., Salt, D.E., (1997). Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 221–226

Raskin I. y Ensley B.D. (2000). *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. John Wiley & Sons, New York. 304 Pp.

Razo S.I. (2002). Evaluación de la contaminación por metales y del riesgo en salud en un sitio minero de sulfuros polimetálicos: caso de villa de la Paz-Matehuala S.L.P (México). Tesis Maestría. Instituto de metalurgia, Facultad de ingeniería, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 132 P.

Reigosa M, Pedrol N, Sánchez A. (2003). La ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis. Editorial Thomson. Barcelona, España. 1193 P. 413-438

Renvoize S.; Clayton W. D.; Kabuye S. (1998). Morfología, taxonomía y distribución natural de *Brachiaria*. P. 18-45. En: *Brachiaria: Biología, Agronomía y Mejoramiento*. Campo Grande, Brasil: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional De Pesquisa De Gado De Corte; Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 312p.

Renvoize, S. (1998). Gramíneas de bolivia. The Royal Botanic Gardens, Kew. 644pp.

Resh, Howard M. (2001). Cultivos hidropónicos, nuevas técnicas de producción. Departamento de ciencia de las plantas. Universidad De La Columbia Británica, Vancouver. Editorial Mundi Prensa.

Ricaurte O, J. (2006). Impacto de genotipos de *Brachiaria* tolerantes a aluminio sobre la calidad de un oxisol de altillanura en el Meta, Colombia. Trabajo de tesis presentado como requisito parcial para optar al título de Magíster en Ciencias, Área de énfasis en suelos. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.

Reyes G, M.; Lara, P.; Sanginés G, J. (2002). Abonado del pasto Tanner (*Brachiaria Radicans* Napper) con purines: rendimiento de forraje y extracción de nutrimentos. *téc pecu méx* 2002;40 (3):265-274.

Rizzi L., Petruzzelli G., Poggio G. Y., Vigna Guidi G. (2004). Soil physical changes and plant availability of Zn and Pb in a treatability test of phytostabilization. *Chemosphere*. 57, 1039-1046.

Rodríguez, R. (2003). Contaminación de acuíferos. Apuntes del curso de calidad de aguas subterráneas y su protección, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. Bolivia.

Rodríguez M, M. (2008). Aislamiento y caracterización de secuencias de genes expresados diferencialmente en *Brachiaria decumbens* Sttapff Cv. Basilisk, Asociados a la resistencia al estrés por aluminio (Al^{+3}) en suelos ácidos. Maestría Thesis, Universidad Nacional De Colombia.

Rodríguez S, M.; Martínez-De La C, N.; Romero P, M.; Del Río, L.: Sandalio, L. (2008). Toxicidad del cadmio en plantas. *Ecosistemas* 17 (3). Septiembre 2008.

Romero-Puertas, M.C.; Corpas, F.J.; Rodríguez-Serrano, M.; Gómez, M., Del Río, L.A.; Sandalio, L.M. (2007). Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *Journal Of Plant Physiology* 164:1346-135.

Romero-Puertas, M.C. (2002). Metabolismo de especies de oxígeno reactivo en plantas de guisante (*Pisum sativum* L.) y peroxisomas de hojas en condiciones de estrés por cadmio. Tesis Doctoral, Universidad de Granada. España.

Rondeux, J., Lecomte, H., Florquin, P. Y Thirion, M. (1996). L'inventaire permanent des ressources ligneuses de la région wallonne: principaux aspects méthodologiques. *Cah. For. Gembloux*, N° 19. Gembloux, Bélgica. 25 Pp.

Rubio, C.; Gutierrez, A.; Martin, A. Revert, C.; Lozano, G.; Harsdisson, A. (2004). El plomo como contaminante alimentario. *Revista De Toxicología*, Vol. 21 Núm. 2-3, Pp 72-80.

Salisbury, F. & Ross, C.W. (1994). *Fisiología Vegetal*. Madrid: Ibero América. P 759.

Salt, D. E.; Krämer, U.; Smith, R.D. and Raskin, I. (2000). The role of root exudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. In: Terry, N.; Bañuelos, G. (Ed.). *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Boca Raton: Lewis Publishers. P.189-200.

Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J., Raskin, I. (1995). Mechanism of cadmium mobility and accumulation In Indian Mustard. *Plant Physiology* 109:1427-1433

Sánchez C, J. (2010). Metodologías analíticas para la determinación de metales tóxicos en muestras de interés ambiental. Maestría Thesis, Universidad Nacional de Colombia.

Sánchez A, López M, Nadal J. (2007). Bioaccumulation of lead, mercury, and cadmium in the greater hite toothed shrew, *Crocidura russula*, From the Ebro Delta (Ne Spain): Sex and age-dependent variation. *Environ Pollut*; 145 (1): 7-14

Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C., Del Río, L.A. (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of Pea Plants. *Journal of Experimental Botany* 52:2115-2126.

Santschi, P.H., Burd, A.B., Gaillard, J.-F., Lazarides, A.A., (2005). Transport of materials and chemicals by nano-scale colloids and micro to macro-scale flocs in marine, freshwater and engineered systems. In: Flocculation in natural and engineered environmental systems, Droppo, I.G., Leppard, G.G., Liss, S.N., and Milligan, T.G., Eds., CRC PRESS, Boca Raton, Fl, Chapter 9, Pp. 191-210.

Saucedo, B.; Rodríguez, A.; Quevedo, O.; Cabrera, L. (2007). Determinación de metales pesados en un suplemento nutricional de origen natural con propiedades antioxidantes. *Lat. Am. J. Pharm.* 26 (5): P 760-4

Seregin, I.; Ivaniov, V. (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 48: 606-630.

Sengar Rs, Gautam M, Sengar Rs, Garg Sk, Sengar K, Chaudhary R. (2008). Lead stress effects on physiobiochemical activities of higher plants. *Rev Environ Contam Toxicol.*; 196:73-93.

- Serrato, M. Ferro, D. Ferraro Y F. Riveros. (1991). Anatomical changes in *prosopis tamarugo* phil. seedlings growing at different levels of nacl salinity. *Annals of Botany* 68: 47 – 53
- Shannon, Jg, RI Nelson and JA Wrather. (2010). Registration of Ig04-6863 soybean germplasm line with diverse pedigree. *J. Of Plant Registrations* 4:70-72.
- Srivastava, N.K.; Majumder, C.B., (2008). Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. *J. Hazard. Mater.* 151, 1e8.
- Stohs, S.J., Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radical biology and medicine* 18:321-336.
- Storelli, M.; Giachi, L.; Giungato, D.; Storelli, A. (2011). Occurrence of heavy metals (Hg, Cd, and Pb) and polychlorinated biphenyls in salted anchovies. *Journal Food Protection* may; 74(5):796-800
- Street, R.A., M.G. Kulkarni, W.A. Stirk, C. Southway, H.S. Abdillahi, M. Chinsamy and J. Van Staden, (2009). Effect of cadmium uptake and accumulation on growth and antibacterial activity of *Merwillia plumbea*-An Extensively Used Medicinal Plant In South Africa. *S. Afr. J. Bot.*, 75: 611-616.
- Strong, D. R.; Phillips D. A. (2001). «Notes from the underground. Communication and Control in the Rhizosphere». *Plant Physiology* 127: Pp. 727–30.
- Sullivan M. (1999). Evaluación de impacto ambiental. En: Kiely G. “Ingeniería Ambiental” Ed. Mcgraw-Hill. España. 1117 – 1150 Pp.
- Sun Y, Zhou O, Diao S. (2008). Effects of cadmium and arsenic on growth and metal accumulation of Cd-Hyperaccumulator *Solanum Nigrum* L. *Bioresour Technol*, 99 (5): 1103-1110.

Takacs, D. (1996). La idea de biodiversidad: filosofías de paraíso, (Baltimore & London: The Johns Hopkins University Press, 1996) pág. 11.

Taiz, L. & Zeiger, E. (2009). Plant Physiology. Third Edition, Copyrights by Sinauer Associates, Inc

Ter Braak, C. J. F. (1987). Unimodal models to relate species to environment. Doc. Th. Agr. Math. Gr. Wagenigen, 152 Pp.

Tesfamariam, T., Bott, S., Neumann, G., Cakmak, I., Römheld, V., (2009). Glyphosate in the rhizosphere role of waiting time and different glyphosate binding forms in soils for phytotoxicity to non-target plants. Eur. J. Agron. 31, 126–132.

Tessier A, Campbell PGC y Bisdorn M. (1979). Anal. Chem. 51:844-. Titov, A. F.; Talanova, V. V.; Boeva, N. P. (1996). Growth responses of barley and wheat seedlings to lead and cadmium. Biol. Plant. 38(3): 431-436

USDA, Ars, National Genetic Resources Program. (2013). Germplasm resources information network - (Grin), [Online Database]. National Germplasm Resources

Valdés P, F. Y Cabrera, M. (1999). La contaminación por metales pesados en Torreón, Coahuila, Mexico. Ciladhac (Ciudadanía Lagunera por los Derechos Humanos, A.C.), 46 P.

Valle, C.B., Bitencourt, G.A., Arce, A.Q., Chiari, L., Jank, L., Resende, R.M.S. & Calixto, S. (2008). Preliminary evaluation of *Brachiaria humidicola* hybrids. [Abstract]. P. 418. In: (Organizing Committee of Igc/Irc Congress, Eds.) Multifunctional Grasslands in A Changing World, Vol li. [Proceedings of the 21st International Grassland Congress. Hohhot, Inner Mongolia, China. 29 Jun. – 05 Jul., 2008. (Guandong People's Publishing House)].

Vegter J.J. (1995): Soil protection in the Netherlands. En Heavy Metals. Salomons W., Förstner U. Y Mader P. (Eds). Springer, Berlin.

Vera, P.; Olivero V, J.; Jaramillo, B.; Stashenko, E. (2010). Efecto protector del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E.: Brown sobre la toxicidad de mercurio en raíces de *Allium cepa* L. Rev Cubana Plant Med [online]. 2010, vol.15, n.1, pp. 0-0. ISSN 1028-4796.

Verma, S.; Dubey, Rs. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Sci. 164: 645-655.

Vesk Pa, & Reichman S. (2009). Hyperaccumulators and herbivores – a bayesian meta-analysis of feeding choice trials. J Chem Ecol 35: 289–296.

Vitarello, V. A.; Capaldi, F. R. and Stefanuto, V. A. (2005). Recent advances in aluminium toxicity and resistance in higher plants. Braz. J. Plant Physiol. 17 (1): 129-143.

Walsh, G.E., D.E. Weber, T.L. Simon, and L.K. Brashers. (1991). Toxicity test of effluents with marsh plants in water and sediments. Environ. Toxicol. Chem. 10:517.

Wang, Z. & Templeton, D. (1996). Cellular factors mediate cadmium dependent actin depolymerization. Toxicol. and Appl. Pharmacol. 139:115-121.

Weis, J & Weis, P. (2004). Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. Environment International Volume 30, Issue 5, July, Pages 685-700.

Wellburn, A. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. J. Plant Physiol.144: 307-313

Weng, L., Temminghoff, E. J. Y Van Riemsdijk, W. H. (2001). Contribution of individual sorbents to the control of heavy metal activity in sandy soil. *Environ. Sci. Technol.*, 35: 4436-43.

Wierzbicka, M. (1998). Lead in the apoplast of *Allium cepa* L. root tips-ultra structural studies. *Plant Sci.* 133: 105-119.

Wierzbicka M., 1999. Comparison of lead tolerance in *Allium cepa* with other plant species. *Environ. Pollut.* 104(1): 41-52.

Wojcik, M & Tukendorf, A. (2004). Phytochelatin synthesis and cadmium localization in wild type of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* September 2004, Volume 44, Issue 1, pp 71-8.

Wozny, A.; Schneider, J.; Gwozdz, E. A. (1995). The effects of lead and kinetin on greening barley leaves. *Biol. Plant.* 37: 541-55.

Wu, C.; Chen, X.; Jianjun, T. (2005). Lead accumulation in weed communities with various species. *comm. In Soil Sci. and Plant Anal.* 36: 1891-1902.

Wua, F., Zhang, G., Dominy, P. (2003). Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. *Environmental and Experimental Botany* 50:63-78.

Yakimova E, Kapchina-Toteva V, Woltering E. (2007). Signal transduction events in aluminum-induced cell death in tomato suspension cells. *Journal of Plant Physiology* 164:702-708.

Yoshida T, Kawai S, Takagi S 2004: Detection of the regions of phyto siderophore release from barley roots. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50, 1111–1114

Zadoks, J.C. & Schein, R.D. (1979). Epidemiology and plant disease management. Oxford University. Press. Oxford. 427 Pp Spp.

Zaharieva T, & Römheld V. (2000). Specific Fe²⁺ uptake system in strategy I plants inducible under Fe deficiency. J. Plant Nutr. 23, 1733–1744.

Zhang, X.H.; Lin, A. J.; Chen, B. D.; Wang, Y. S.; Smith, S. E.; Smith, F. A. (2006). Effects of glomus mosseae on the toxicity of heavy metals to *Vicia faba*. J. Environ. Sci. 18: 721-726.

Zhixuan, H.: Xiangyang B, B.; Zhonggen, L.: Wenlin Y, B.; Lixing W, H.; Fanglin, L.; Zhendong, M. (2012). Occurrence, speciation and bioaccessibility of lead in Chinese rural household dust and the associated health risk to children. Atmospheric Environment Volume 46, January 2012, Pages 65–70.

Zimmerman, A.; Weindorf, D. (2010). Heavy metal and trace metal analysis in soil by sequential extraction: A review of procedures. International Journal of Analytical Chemistry Volume 2010 (2010), Article Id 387803, 7 Pages

Zhou W, & Qiu, B. (2005). Effects of cadmium hyperaccumulation on physiological characteristics of sedum *Alfredii hance* (Crassulaceae). Plant Sci. 169: 737-745.

Zoghlami L, Djebali W, Chaib W, Ghorbel M. Modification physiologiques et structurales induites par l'interaction cadmium-calcium chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*). C R Biologies. 2006; 329:702-71.

Zulak, K. G., Khan, M. F., Alcantara, J., Schriemer, D.C. and Peter J. Facchini. (2009). Plant defense responses in opium poppy cell cultures revealed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry proteomics. Molecular & Cellular Proteomics 8.1:86-98

WEBGRAFIA

Acebedo s, f. (2010). Ganadería bovina en Santander. Universidad de Santander (disponible en internet, julio de 2011). https://www.google.com.co/?gws_rd=cr&ei=g_douvbtiiibskafduocyaq#q=ganaderia+en+santander+colombia.

Agronet (2012). Estructura de la producción de carne bovina en Colombia. (Disponible en internet 2013). http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/public/boletines/insumosdane/insumos_factores_de_produccion_octubre_2012.pdf

Consejería de medio ambiente de la junta de Andalucía (1999). Los criterios y estándares para declarar un suelo contaminado en Andalucía y la metodología y técnicas de toma de muestra y análisis para su investigación. (Disponible en internet, diciembre de 2013). <http://www.ugr.es/~fjmartin/criterios%20y%20estandares.pdf>

Cranton, ja. (2007) Mercury and other metal tests are often performed incorrectly, causing false high results, frightening people unnecessarily (disponible en internet, julio de 2011). <http://www.drccranton.com/mercury/mercurytesting.htm>

EPA. (2006). Air quality criteria for lead. Final report. U.S. environmental protection agency, Washington, DC, EPA/600/r-05/144af-bf, 2006. (http://www.epa.gov/ttn/naaqs/standards/pb/s_pb_cr_cd.html)

EPA. (2007). The national water quality inventory: report to congress for the 2002 reporting cycle – a profile. (Disponible en internet, septiembre de 2011). <http://www.epa.gov/owow/305b/2002report/factsheet2002305b.pdf>

EPA. (2013). Human health and lead. (Disponible en internet, agosto de 2013). <http://epa.gov/superfund/lead/health.htm>

FEDEGAN. (2013). Colombia busca ser declarado libre de brucelosis bovina en 2020. (Consultado en internet, en 24 de octubre de 2013). [Http://www.fedegan.Org.co/noticias/colombia-busca-ser-declarado-libre-de-brucelosis-bovina-en-2020](http://www.fedegan.Org.co/noticias/colombia-busca-ser-declarado-libre-de-brucelosis-bovina-en-2020)

GREEN CHOICE ALLIANCE. (2010). Study of heavy metal pollution by it brand supply chain. The it industry has a critical duty to prevent heavy metal pollution. (Consultado en internet, en agosto de 2011). [Http://www.pacificenvironment.Org/downloads/gca%20it%20campaign%20report%20phase%20one.pdf](http://www.pacificenvironment.Org/downloads/gca%20it%20campaign%20report%20phase%20one.pdf).

ICA. Resolución 2705 de (2011). Diario oficial. Emergencia fitosanitaria. (Consultado en internet, en agosto de 2011) <http://www.ica.gov.co/noticias/pecuaria/2009/el-ica-informa-que---.aspx>

Juarez, F. (2006). Evaluación nutricional de leguminosas tropicales. [online]. México. [cited juio3 enero 2013]. (Disponible en internet: <http://tiesmexico.cals.Cornell.edu/courses/shortcourse1/minisite/pdf/3/evaluaci%c2%a2n%20nutricional%20de%20leguminosas%20tropicales.pdf>).

Juarez, M.; Cerdán, M.; Sánchez, A. (2012). Hierro en el sistema suelo planta. Departamento de agroquímica y bioquímica. Facultad de ciencias. Universidad de alicante. Revisión. (Consultado en internet, en agosto de 2011) <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/1845/1/hierro.pdf>

Labanowski J, Monna F, Bermond A, Cambier P, Fernández C, Lamy I, (2008). Kinetic extractions to assess mobilization of Zn, Pb, Cu, and Cd in a metal-contaminated soil: EDTA vs. Citrate. *Environ pollut.* 2008; 152 (3): 693-701. Laboratory, Beltsville, Maryland. Url:<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?7549> (01 June 2013).

Lagunes J. F. (s.f). Evaluación nutricional de leguminosas tropicales. (Consultado en internet, en agosto de 2013) <http://www.ica.gov.co/noticias/pecuaria/2009/el-ica-informa-que---.aspx>

Miles J.; Dovalle, C.; Rao, I.; Euclides, V. (2004). *Brachiaria grasses*. P.745-783 In: Moser, L.; Burson, B.; Sollenberger, L. E. (Eds). Warm-season (C₄) grasses. Madison, WI, USA: Asa-Ssa-Sssa. Missouri botanical garden - w3tropicos. (2013) [online database]. URL: <http://www.tropicos.org/namesearch.aspx?Projectid=3&langid=66> (4 July 2013).

Molino, V. (2012). Presencia de metales pesados en suelos, pasturas y leche bovina, en áreas Agrícolas expuestos a emisiones de actividades industriales. (Disponible en internet: <http://prezi.com/osyaz0idsuvr/copy-of-presencia-de-metales-pesados-en-suelos-pasturas-y-leche-bovina-en-areas-agricolas-expuestos-a-emisiones-de-actividade>)

Navarro-Aviño, J. A. P; Aguilar, I. A; López, J. R. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. Revista ecosistemas. España. (disponible en internet, julio 12 de 2011)

Red de Laboratorios del PRONALSA. (2004). www.xoc.uam.mx/pronalsa/tabla3.pdf

Pessino, S.; Ortiz, J., Echenique, V.; González, A.; Seijo, G. Quari, C. (2008). Apomixis: una herramienta poderosa para el mejoramiento revista agromensajes. No. 12. Publicación cuatrimestral de la facultad de ciencias agrarias una distribución gratuita Issn: 16698584 (Disponible en internet, julio de 2011). [Http://www.fcagr.unr.edu.ar/extension/agromensajes/26/2am26.htm](http://www.fcagr.unr.edu.ar/extension/agromensajes/26/2am26.htm)

Plan de desarrollo departamental (2008-2011). 2011. Horacio Serpa Uribe – Gobernador de Santander. Departamento de Santander, diagnóstico económico y social. 2008. (disponible en internet, julio de 2011) http://www.santander.gov.co/santander/documentos/economia_de_santander.pdf

Quintero, A. (2010). El derrame de petróleo y los cayos de la florida: ¿qué hacer y que no hacer? Datos del oceno. Natural resources defense council June 2010 (consultado junio 15 del 2013). [Http://reefrelief.org/wp-content/uploads/spflkeysoilspill-dodont-13.pdf](http://reefrelief.org/wp-content/uploads/spflkeysoilspill-dodont-13.pdf)

Rodríguez H, Sánchez E, Rodríguez M, Vidales J A., Acuña K A., Martínez Gavo Y Rodríguez J. (2013). Metales pesados en leche cruda de bovino. México. [revista electrónica] salud pública y nutrición. 2005; 6(4). [consultado junio 15.]. Url disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/vi/4/articulos/metales>.

Ruiz, O. (2011). Guía para el muestreo de suelos. Documento de estudio. Universidad nacional de Colombia. Sede Medellín. (Disponible en internet: <http://www.unalmed.edu.co/~esgeocien/documentos/laboratorio/guia%20para%20el%20muestreo.pdf>).

RUIZ HUERTA, Esther Aurora y ARMIENTA HERNANDEZ, María Aurora. Acumulación de arsénico y metales pesados en maíz en suelos cercanos a jales o residuos mineros. Rev. Int. Contam. Ambient [online]. 2012, vol.28, n.2 [citado 2013-06-25], pp. 103-117 . Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992012000200001&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0188-4999.

Villanueva, C.; Ibrahim, M.; Rios, J. & Suarez, J. (2008). Disponibilidad de *Brachiaria brizantha* en potreros con diferentes niveles de cobertura arbórea en el trópico subhúmedo de costa rica. Zootecnia trop. [Online]. (2008), vol.26, n.3 [citado 2013-09-10], pp. 293-296. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0798-72692008000300029&lng=es&nrm=iso>. Issn 0798-7269.

Zimmermann, M. (2001). Adaptaciones de plantas a estrés abiótico que les permiten vivir y prosperar en diferentes condiciones ambientales. <Http://agro.unc.edu.ar/~fisveg/salinidad%20y%20estres.htm>

Zimmerman, Amanda and David C. Weindorf. (2010). Heavy metal and trace metal analysis in soil by sequential extraction: a review of procedures. International journal of analytical chemistry volume 2010 (2010), article id 387803, 7 pages. (Disponible en internet, julio de 2011) <http://www.hindawi.com/journals/ijac/2010/387803/cta/>

Zubero, O ; Leagoitia, M ; Aurrekoetxea, A ; Ibarluzea; J; Maurologoitia, J. ; Arenaza, A. ; Basterretxea, Mikel, Rodríguez A. 2008. Metales pesados (Pb, Cd, Cr y Hg) en población general adulta próxima a una planta de tratamiento de residuos urbanos de bizkaia. Rev. Esp. Salud publica [revista en el internet]. [Citado 2013 jul 28] ;82(5): 481-492. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1135-57272008000500004&lng=es.