

Uso de plantas de pepinillo (*Cucumis sativus*) para fitorremediar suelos contaminados con cromo

PAOLA CIFUENTES MORALES ^a * FERNANDO NOVILLO LOGROÑO ^a

^a Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Central del Ecuador, Quito-Ecuador

*Correspondencia: paopao_wi@hotmail.com

Recibido: 03 de octubre de 2016, Aceptado: 10 de noviembre de 2016

Resumen

En esta investigación se reporta un proceso de fitorremediación de suelos contaminados con cromo (VI), utilizando un cultivo de la especie *Cucumis sativus* (pepinillo), mediante sistemas de fitoestabilización y fitoinmovilización. Para determinar la capacidad de absorción y el crecimiento de la planta, se germinaron las semillas directamente en suelos contaminados con el metal que poseen las siguientes características: T1 (63 mg Cr/kg de suelo), T2 (125 mg Cr/kg de suelo) y T3 (250 mg Cr/kg de suelo) en función de peso húmedo. Las plantas se recolectaron a los 30, 60 y 80 días posteriores a los 8 días de la germinación. Los datos fueron estudiados mediante un análisis de varianza y prueba de Dunnett. Los resultados demuestran que las plantas de pepinillo presentan diferencias estadísticamente significativas frente al tratamiento testigo ($p < 0.05$), pues se encontró que después de 80 días de cultivo en condiciones de invernadero, la plántula redujo los niveles de cromo en un 38% T1; 34% T2 y 31% T3.

Palabras clave: contaminación, cromo, fitorremediación, *Cucumis sativus*, pepinillo.

Using cucumber plants (*Cucumis sativus*) for soils contaminated with chromium phyto remediate

Abstract

In this research, a process of phyto remediation of contaminated with chromium (VI) using a crop *Cucumis sativus* species (Gherkin) by phytostabilization systems and soils phytoimmobilisation is reported. To determine the absorptive capacity and growth of the plant, the seeds are germinated directly contaminated with metal soils having the following characteristics: T1 (63 mg Cr / kg soil), T2 (125 mg Cr / kg soil) and T3 (250 mg Cr / kg soil) based on wet weight. Plants were harvested at 30, 60 and 80 days after 8 days of germination. The data were studied by analysis of variance and Dunnett's test. The results show that plants Gherkin statistically significant differences compared to control treatment ($p < 0.05$) because it was found that after 80 days of culture in the greenhouse, seedling chromium levels reduced by 38% T1; 34% T2 and 31% T3.

Keywords: pollution, chromium, phyto remediation, *Cucumis sativus*, gherkin.

1. Introducción

La contaminación por metales pesados constituye en la actualidad una de las problemáticas ambientales más preocupantes en todo el mundo (Shanker, 2005). El cromo es uno de los metales más importantes debido a su amplio uso industrial. La contaminación del suelo y agua es resultado de un vertido incontrolado de contaminantes con cromo, como consecuencia de una sociedad cada vez más industrializada, lo que incrementa los niveles de cromo en el ambiente, representando un peligro para la salud. El cromo puede ser generado mediante los efluentes de las industrias del curtido de cuero, acero inoxidable, aleaciones, pinturas, cementos, pigmento para impresoras y cromado, entre otros.

En el Ecuador, la mayor parte de curtiembres se encuentran ubicadas en la provincia de Tungurahua, seguido del Guayas, Cuenca y Pichincha. La contaminación química se produce porque en las curtiembres solamente el 80% del cromo reacciona en el cuero y el 20% restante sale con el agua que se descarga sin previo tratamiento. El principal problema es que el contaminante es introducido a través de los efluentes

y contamina las corrientes de agua que podrían ser utilizadas como fuentes de riego para la agricultura (Dheri, 2007). Es por ello que estrategias de remediación son necesarias para eliminar los contaminantes *in situ* antes de que puedan introducirse en la cadena alimentaria.

Los métodos convencionales suelen ser costosos, por lo que, la fitorremediación representa una alternativa sustentable y de bajo costo para la restauración de ambientes afectados por contaminación (Singh, 2003). Actualmente, de 6 a 8 mil millones de dólares son invertidos en limpieza del ambiente en los Estados Unidos y de 25 a 50 mil millones por año en todo el mundo (Tsao, 2003).

La fitorremediación utiliza plantas de rápido crecimiento vegetativo, las cuales tienen la capacidad de absorber y tolerar a los metales pesados, para eliminar, retener o disminuir la toxicidad de contaminantes en el suelo (Chaney, 1997). Las fitotecnologías son un conjunto de técnicas que tienen lugar en las plantas y microorganismos asociadas a ellas, tales como se muestran en la Figura 1.

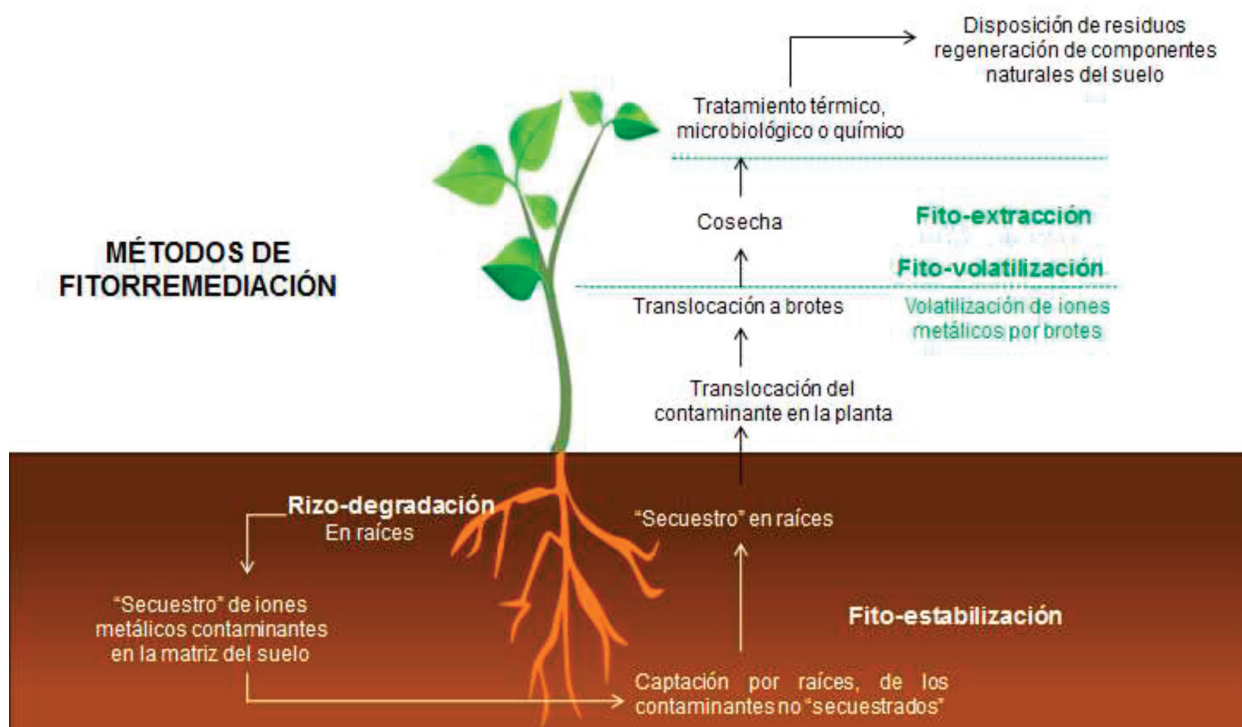


Figura 1. Mecanismos relacionados con la remoción de contaminantes mediante una representación esquemática de técnicas de fitorremediación (Singh, 2003).

La absorción de cromo desde la solución nutritiva del suelo es un mecanismo no muy bien conocido hasta el momento. A pesar de que las plantas acumulan cromo de las soluciones nutritivas retienen la mayor parte en las raíces, su translocación a la parte aérea es baja, creyéndose que la mayor parte de cromo es absorbida por intercambio iónico en las paredes de los vasos xilemáticos. Posiblemente una de las razones de la baja tasa de transporte del cromo sea la compartimentación vacuolar, falta de transportadores específicos o la inhibición por sulfatos. La primera interacción que tiene la planta con el cromo es durante su proceso de absorción. Por lo tanto, ésta se realiza a través de transportadores utilizados para la absorción de metales esenciales en el metabolismo de la planta (Cary, 1977).

La vía del cromo hexavalente es un mecanismo activo que afecta a la absorción de aniones esenciales, tales como el sulfato (Cervantes, 2001). Los elementos como el hierro, azufre y fósforo también compiten con el cromo para ser transportados (Wallace, 1976), debido a su similitud estructural con algunos elementos esenciales.

El cromo (VI) por competir con diversos elementos de similar estructura electrónica, parece ser que tiene la ventaja de entrar en el sistema de la planta, además, éste es absorbido rápidamente, a diferencia de cromo (III) (elemento traza esencial) que lo hace en forma pasiva y es retenido por los sitios de intercambio catiónico de la pared celular (Shanker, 2004). Esto explica en parte, la mayor acumulación de Cr (VI) por las plantas. Por otro lado, el cromo (VI) es un elemento tóxico y no es esencial para las plantas, por lo tanto, no poseen ningún mecanismo específico de transporte (Shanker, 2005).

Tanto el cromo (VI) como el cromo (III) tienen que cruzar a través de la membrana plasmática de las células de la raíz, el cromo (VI) probablemente se reduce fácilmente a cromo (III), de acuerdo al modelo hipotético de transporte del cromo y toxicidad en las raíces de la planta según Shanker (2004). Por lo que los residuos vegetales generados por el proceso de fitorremediación no se considerarían como residuos peligrosos, de modo que, ya no deberían ser tratados para posteriormente eliminarlos.

La especie *Cucumis sativus* pertenece a la familia Cucurbitaceae previamente ya se ha utilizado para la remediación de matrices ambientales contaminadas con cromo, sin embargo, no se obtuvieron buenos resultados debido a que el crecimiento de la planta fue inhibida a concentraciones de 500 ppm y no se detectó cromo en las plantas analizadas después de 70 días

de crecimiento (Butler, 2009), aun así este proyecto se usó como guía para el diseño de esta investigación.

En la presente investigación, se reporta el desarrollo de la técnica de fitorremediación, no sólo para la remediación misma, sino también para la regeneración de las características del suelo para su cultivo, especialmente recuperando la matriz a los niveles establecidos por la Norma Ambiental (Decreto N° 3516) para suelos en remediación.

2. Materiales y métodos

Las muestras de suelo fueron recolectadas de suelos agrícolas de la parroquia de Yaruquí - Oyambarillo, Pichincha, Ecuador. El suelo colocado en las macetas, previo a la siembra de las semillas de *C. sativus*, se determinó el: pH, conductividad, humedad, materia orgánica, capacidad de cambio catiónico, nitrógeno, fósforo asimilable, cromo (VI) y cromo total (cromo III y cromo VI).

2.1. Tratamiento con cromo

Como fuente de cromo (VI) se empleó dicromato de potasio al 99.5% dado que es la forma más biodisponible para las plantas en el suelo. El suelo en el cual se cultivó las plantas de *C. sativus* se contaminó con el metal hasta la completa saturación, es decir, hasta que visualmente todos los espacios del suelo estuvieron completamente humedecidos.

2.2. Siembra de semillas de *Cucumis sativus*

Las semillas de *C. sativus* son certificadas con una pureza del 99.9 % y una germinación del 85.0 % (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 1991). Estas semillas, se sembraron a 2 cm de profundidad en macetas con una capacidad aproximada de 1,5 kg de suelo bajo condiciones de invernadero, es decir, bajo una estructura recubierta de película de plástico debido a que la zona de siembra presenta vientos fuertes muy frecuentes y el objeto es asegurar la estabilidad de las unidades experimentales.

2.3. Acondicionamiento del suelo contaminado

Cuando las plantas alcanzaron la tercera semana de edad se procedió a fertilizar el suelo, de tal manera que garantice el crecimiento y desarrollo de las plantas suministrando todos los elementos necesarios, este proceso se lo realizó a intervalos de 7 – 10 días. En cada maceta se aplicó 200 mL de fertilizante soluble

NUTRI-LEAF 20N – 20P – 20K, cuidando de que no entre en contacto directo con la raíz de la planta. La dosis general recomendada por el fabricante para la especie curcubitácea es de 1 kg de fertilizante por cada 200 litros de agua.

2.4. Diseño del experimento

Las pruebas de toxicidad a la especie *C. sativus* se evaluaron con tres concentraciones nominales: T1 (63 mg Cr/kg de suelo), T2 (125 mg Cr/kg de suelo) y T3 (250 mg Cr/kg de suelo) más el control (CT). El tratamiento control es aquel que no incluye contaminación con dicromato de potasio, siendo de gran importancia ya que constituye un tratamiento referencial de la investigación. Se establecieron tres repeticiones por concentración, con un total de 36 unidades experimentales, con un diseño factorial en bloque completo al azar (DBCA), donde se consideraron tres fuentes de variabilidad: el factor de tratamientos, el factor de bloques y el error aleatorio. Las diferencias significativas se calcularon mediante un ANOVA, seguido de un procedimiento de comparación múltiple de Dunnett con el objeto de localizar el tratamiento que sea diferente o mejor que un tratamiento de control a nivel de significancia de 0.05. Los análisis estadísticos se realizaron usando Microsoft Excel 2010 (v14.0) como parte de Office 2010 que se caracteriza por ser un software de hojas de cálculo.

2.5. Muestra de plantas de pepinillo

Se recolectaron aleatoriamente las muestras de toda la planta de pepinillo en bolsas de polietileno con cierre hermético a los 30, 60 y 80 días hasta que se cumpla el ciclo vegetativo, posteriores a los 8 días de germinación.

2.6. Muestra del suelo de cultivo

El suelo se muestreó superficialmente haciendo uso de una espátula de acero inoxidable, obteniendo una muestra de 250 g en bolsas de polietileno con cierre hermético. En el caso de hallar la presencia de restos de plantas y piedras, se retiran previamente al muestreo.

2.7. Muestra del fruto

El fruto que se encontraba disponible se cosechó al término de su ciclo vegetativo, es decir, se obtuvieron de 1 a 2 frutos por planta.

2.8. Procedimiento general de digestión

Las muestras del suelo y del vegetal se secaron en una estufa a 105°C por 2 horas en cápsulas de porcelana, una vez secas se disgregaron manualmente y posteriormente se tamizaron por una malla de 2 mm de diámetro. El suelo se trasladó a un vaso de precipitación, se añadió 10 mL de ácido nítrico al 69.2% y 50 mL de agua desionizada, para el tejido vegetal se añadió 5 mL de ácido nítrico, 5 mL de ácido perclórico al 70% y 25 mL de agua desionizada. Se hirvió hasta que el volumen original se redujo en un 50%. Se aforó en balones de 100 mL y se analizó por espectroscopia de absorción atómica en llama (Standard Methods, 1997).

2.9. Cuantificación del cromo

Se utilizó el Método directo de llama de aire-acetileno EPA 3050 A y EPA 7420. La determinación de cromo total se llevó a cabo por espectroscopia de absorción atómica en un equipo marca Perkin Elmer; modelo AAnalyst 100, HGA – 800.

3. Resultados y Discusión

3.1. Desarrollo de las plantas de pepinillo

Las semillas de pepinillo germinaron en los tres tratamientos de suelo contaminado con cromo; durante etapas tempranas de su crecimiento las plantas no presentaron cambios manifestados exteriormente como: inhibición del crecimiento, clorosis (Foroughi, et al., 1979) e inhibición de germinación (Mukherji, 1977), lo que es un buen indicativo de la posible tolerancia de la planta (Carillo, 2002). Prueba de ello, inicia con la absorción de agua y se completa cuando el eje del embrión comienza a elongarse (Crawford y col., 2000). La movilización de las reservas (almidón, proteínas y lípidos) se lleva a cabo y se promueve entonces el crecimiento de la planta. Lo que puede significar que la movilización de las reservas no fue afectada por la presencia de cromo en dichas concentraciones, y por lo tanto el embrión creció.

No se observaron diferencias durante el desarrollo de las plantas sembradas en suelo contaminado con cromo y el tratamiento de control, es decir, después de los 8 días de germinación en ambos casos, las plantas comenzaron a desplegar los cotiledones, las hojas comenzaron a aparecer después de los 15 días de siembra, llegando a su completo desarrollo a los 25 días. La etapa de crecimiento no presentó dificultad, permitiendo un buen desarrollo sin observarse disminución en el crecimiento longitudinal respecto al

tratamiento de control; siendo capaces de crecer, florecer y fructificar; a pesar de ello, 1 de 36 unidades experimentales presentó un ligero amarillamiento en sus hojas (efecto de clorosis) como un síntoma de fitotoxicidad probablemente inducida por la presencia de cromo, lo que parece estar relacionada con la falta de Fe (Huffman, 1973). El resultado concuerda parcialmente con los obtenidos por Turner y Rust (1971) con una disminución en la concentración de Fe en raíces y partes aéreas en plantas de soja tratadas con cromo en cultivo hidropónico.

3.2. Concentración de cromo en la planta y en el suelo

La concentración de cromo absorbido por la planta de pepinillo para el día 30 en los tres tratamientos es del 29%, para el día 60 se considera un aumento considerable con un 32% mientras que para el día 80 incrementó a un 38%. Seguidamente en la Tabla 1 se presenta las concentraciones de cromo absorbida por la planta durante el tiempo de investigación.

Tabla 1. Contenido de cromo absorbido por la planta de pepinillo

Tratamientos	Planta			
	T1	T2	T3	CT
Día 30	24,15	26,99	58,07	4,24
	20,03	35,22	62,17	4,19
	21,62	38,95	61,58	4,22
$\bar{X} \pm SD$	21,93 \pm 2,08	33,72 \pm 6,12	60,61 \pm 2,22	4,22 \pm 0,03
CV	9,47	18,15	3,66	0,60
Día 60	23,74	39,91	68,51	4,35
	22,15	42,99	67,55	4,56
	22,16	39,34	66,71	4,46
$\bar{X} \pm SD$	22,68 \pm 0,92	40,75 \pm 1,96	67,59 \pm 0,90	4,46 \pm 0,11
CV	4,03	4,82	1,33	2,36
Día 80	27,87	45,48	72,01	4,60
	30,45	41,59	87,19	4,48
	31,11	46,80	75,15	4,72
$\bar{X} \pm SD$	29,81 \pm 1,71	44,62 \pm 2,71	78,12 \pm 8,01	4,60 \pm 0,12
CV	5,74	6,07	10,26	2,61

Los datos muestran el contenido de cromo en $mg\ kg^{-1}$ de peso seco para cada tratamiento; se presentan valores promedio \pm desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (CV) para tres repeticiones.

La cantidad de cromo almacenada por la planta es similar en los tres tratamientos durante los primeros 30 días, la velocidad de absorción de cromo fue relativamente rápida. Sin embargo, entre los 60 y 80 días se observó un incremento lento en la absorción que se mantiene constante, de modo que, durante el proceso se tiene un intervalo de remoción de cromo de 20,03 a 87,19 $mg\ kg^{-1}$.

La rápida absorción de la planta puede indicar que en la etapa temprana de crecimiento su absorción podría estar aumentando para suministrar el aporte necesario de nutrientes que requiere y luego se vuelve menos rápida durante su etapa final; esta deducción responde a los patrones propuestos por Chen (2000) que relacionan la biodisponibilidad de los nutrientes y su absorción. En el patrón tipo 1, la absorción se

incrementa con el crecimiento del cultivo para luego caer cuando el cultivo alcanza la madurez. Este patrón es observado en la absorción de la mayoría de los macronutrientes como el nitrógeno, fósforo y potasio. El patrón 2, es similar al 1 pero presenta un pico más pronunciado y se ha observado que se asocia con la absorción de micronutrientes como el cobre y zinc. El patrón tipo 3, presenta una absorción elevada en las primeras etapas del desarrollo y cae durante las siguientes etapas. Este patrón se observa para los metales pesados como el arsénico, cadmio, cromo, plomo, níquel y mercurio.

En el suelo se observa que a los 30 días, las concentraciones de cromo en todos los tratamientos disminuyeron en un 38%, debido a que la absorción de cromo por parte de la planta de pepinillo no fue afectada

por la fijación de este elemento. Para el día 60, se observó una disminución del 34% y para el día 80 disminuyó en un 31%. La figura 2 muestra la cantidad de cromo presente en la planta y en el suelo, cabe destacar que inicialmente y como parte de la caracteriza-

ción del suelo agrícola se determinó la concentración de cromo total y cromo (VI), estos datos son tomados como datos iniciales para la representación en la gráfica a tiempo cero.

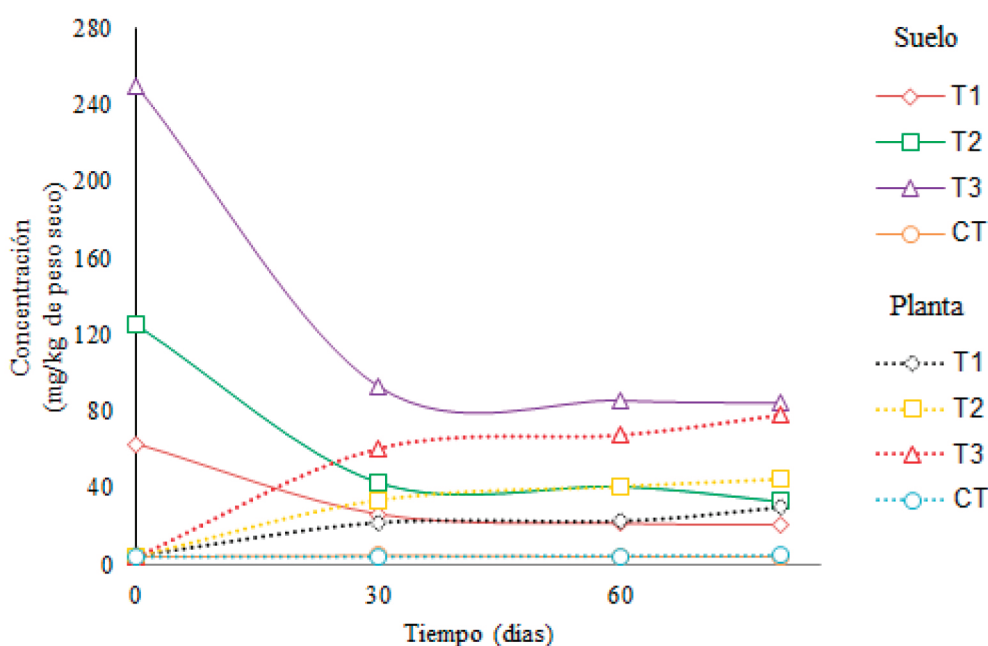


Figura 2. Representación del comportamiento del contenido del cromo en la planta y en el suelo en función del tiempo, siendo: CT tratamiento de control, T1, T2 y T3 concentraciones de 63, 125 y 250 mg Cr/kg de suelo, respectivamente.

Además, el contenido de cromo en el fruto, al término de su ciclo, es menor a 0.04 mg/L para los tres tratamientos al igual que para el tratamiento de control; se puede deducir que el cromo no fue transportado al fruto, debido a que se retiene la mayor parte en las raíces de la planta lo que podría deberse a que el cromo se inmoviliza en las vacuolas de las células de la raíz, lo cual lo hace menos tóxico, ya que puede ser respuesta natural de la planta (Shanker, 2004). En las plantas, generalmente, se observa un contenido de cromo mayor en las raíces que en las hojas y tallos, mientras que la concentración más baja está en los granos (James, 2002).

En la Tabla 2 se muestra de manera más clara el tiempo que tarda la planta de pepinillo en remover el cromo del suelo contaminado mediante el efecto de su cultivo.

Tabla 2. Remoción de cromo por la planta de pepinillo

Especie	(% Remoción / Tiempo (días))		
	T1	T2	T3
<i>Cucumis sativus</i>	42/30	34/30	37/30

3.4. Estudio estadístico

En la Tabla 3 se presentan los resultados del análisis de varianza para los diferentes tratamientos realizados.

Tabla 3. Resultados del ANOVA, en la evaluación del contenido de cromo en el suelo.

Tiempo (días)	Fuentes de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tab
30	Bloques	2	2.25	1.12	0.47 ^{ns}	5.14
	Tratamientos	3	12869.31	4289.77	1814.67 [*]	4.76
	Error	6	14.18	2.36		
	Total	11	12885.74			
60	Bloques	2	5.05	2.53	1.53 ^{ns}	
	Tratamientos	3	11111.43	3703.81	2241.10 [*]	
	Error	6	9.92	1.65		
	Total	11	11126.41			
80	Bloques	2	1.86	0.93	1.46 ^{ns}	
	Tratamientos	3	10788.14	3596.05	5642.26 [*]	
	Error	6	3.82	0.64		
	Total	11	10793.82			

(*) significativo a un valor de probabilidad de $p < 0.05$ ns: no significativo

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, el hecho de que no haya diferencias entre bloques no es de importancia particular ya que los bloques son una fuente de variación conocida, sin embargo, la variación entre bloques también puede probarse. En este caso, no es significativa. La prueba F de bloques es válida, pero debe interpretarse con cuidado.

Mientras tanto, hubo una reducción de las concentraciones de cromo para todos y cada uno de los tratamientos, donde el valor de F calculada supera al valor de F crítica al 5 por ciento los cuales determinan que existe diferencia y es significativa, debido a ello se realizó una prueba de Dunnett (1955) para dos colas con $\alpha = 0.05$ para poder evaluar con interés secundario las diferencias que presentan cada tratamiento en relación al tratamiento control. En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 4. Prueba de medias de Dunnett para el contenido de cromo en el suelo

Tiempo (días)	Diferencia	Diferencia comparada con el valor Dunnett	Decisión
30	$\bar{Y}_{T1} - \bar{Y}_k$	$26.39 - 4.06 = 22.33^* > 3.59$	Significativa
	$\bar{Y}_{T2} - \bar{Y}_k$	$42.86 - 4.06 = 38.80^* > 3.59$	Significativa
	$\bar{Y}_{T3} - \bar{Y}_k$	$93.05 - 4.06 = 88.99^* > 3.59$	Significativa
60	$\bar{Y}_{T1} - \bar{Y}_k$	$21.54 - 4.07 = 17.47^* > 3.00$	Significativa
	$\bar{Y}_{T2} - \bar{Y}_k$	$40.76 - 4.07 = 36.69^* > 3.00$	Significativa
	$\bar{Y}_{T3} - \bar{Y}_k$	$85.68 - 4.07 = 81.61^* > 3.00$	Significativa
80	$\bar{Y}_{T1} - \bar{Y}_k$	$20.83 - 4.05 = 16.78^* > 1.87$	Significativa
	$\bar{Y}_{T2} - \bar{Y}_k$	$32.89 - 4.05 = 28.84^* > 1.87$	Significativa
	$\bar{Y}_{T3} - \bar{Y}_k$	$84.34 - 4.05 = 80.29^* > 1.87$	Significativa

\bar{Y}_T corresponde a los valores promedio obtenidas de cada tratamiento y \bar{Y}_k a los promedios de cada tratamiento de control.

Para todos los resultados existe diferencia significativa entre los tratamientos respecto al control, por lo tanto, puede decirse que hubo absorción por parte de la planta en los tres tratamientos. Bajo el mismo criterio se procedió a realizar los demás cálculos para el contenido de cromo en la planta de pepinillo, presentando los mismos resultados.

4. Conclusiones

El contenido de cromo en el suelo contaminado disminuyó después de los 80 días para los tratamientos T1 y T2, consiguiendo llegar a los niveles exigidos por

la Norma para Suelos en Remediación (Decreto N° 3516) y por lo tanto, se podría utilizar como suelo para cultivar la especie *C. sativus*, sin embargo, para el T3 no se consiguió llegar a los niveles exigidos por la Norma, no obstante, se podría realizar siembras sucesivas hasta alcanzar su remediación.

La capacidad mostrada por *C. sativus* para tolerar y acumular cromo de un suelo contaminado, en tiempos relativamente cortos, le hace una especie que podría utilizarse en procesos de fitorremediación. Esta estrategia requiere menos recursos que sus contrapartes químicas, constituyendo así una alternativa atractiva.

Referencias

1. Butler, R. (2009). Investigation of the use of cucumis sativus for remediation of chromium from contaminated environmental matrices. *Journal of Chemical Education*, 1095 - 1098.
2. Carrillo, G. (2002). Alfalfa Growth Promotion by Bacteria Grown Under Iron Limiting Conditions. *Advances in Environmental Research*, 391 - 399.
3. Cary, E.E., Allaway, W.H., Olson, O.E. (1977). Control of chromium concentration in food plants, 1. Absorption and translocation of chromium by plants. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 25: 300-304.
4. Cervantes, C. (2001). Federation of European Microbiological Societies. Interactions of chromium with micro organisms and plants, 335 - 347.
5. Chaney, R. (1997). Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion Biotechnology*, 279-284.
6. Chen Z.S. (2000). Relationship between heavy metal concentrations in soils of Taiwan and uptake by crops. Department of Agricultural Chemistry. National Taiwan University. Recuperado de: <http://www.agnet.org/library.php?func=view&id=20110728162346>.
7. Crawford, N.M., Kahn, M.L., Leustek, T. y Long, S.R. (2000). Nitrogen and Sulfur. En: Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L.(eds). *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of plant physiologists, Rockville. pp 786-849.
8. Decreto N° 3516. Edición Especial No. 2 del Registro Oficial; Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente, Quito – Ecuador, 31 de marzo del 2003. Norma de Calidad Ambiental del Recurso Suelo y Criterios de Remediación para Suelos Contaminados, Libro VI Anexo 2. Pág. 362, 364.
9. Dheri, G.S., Brar, M.S., Malhi, S.S.(2007). *Communications in Soil Science and Plants Analysis* 38, 1655-1672.
10. Dunnett, C. (1955). A multiple comparison produce for comparing several treatments with a control. *Journal of the American Statistical Association*, 1096 - 1121.
11. Foroughi, M., Hoffmann, G., Teicner, K., Venter, F., (1979). The effect of increasing levels of cadmium or nickel in tomatoes in nutrient solution. In *Stand und Leistung Agriculturnchemischer und Agrobiologischer Forschung*.
12. Gobierno de Costa Rica, Ministerio de Agricultura y Ganadería (1991). Aspectos Técnicos sobre Cuarenta y Cinco Cultivos Agrícolas de Costa Rica. San José: Autores. Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola. University of Texas, Cucumis sativus. Pág. 348-352. Editora Eleonor Vargas Aguilar.
13. Huffman, Jr. E., Allaway, W (1973). Chromium in plants: Distribution in tissues, organelles and extracts, and availability of bean leaf chromium animals. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 21: 982.
14. James, B.R. (2002). Chemical transformation of chromium in soils relevance to mobility, bio-availability and remediation. The chromium file from the International Chromium Development Association, France. No. 8. Recuperado de: <http://icdachromium.com/pdf/publications/crfile8feb02.htm>
15. Mukherji, S., Roy, B.K (1977). Toxic effects of chromium on germinating seedlings and potato tuber slices. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 171, 235 -238.
16. Shanker, A. K. (2004). Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram. *Plant Science*, 1035-1043.
17. Shanker, A. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environmental Internacional*, 739 - 753.
18. Singh, O.V., S. Labana, G. Pandey, R. Budhiraja y R.K. Jain, (2003). Phytoremediation: An Overview of Metallic Ion Decontamination from Soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61: 405 - 412.
19. Standard Methods for the examination of water and wastewater, (1997). Preliminary Treatment of samples nitric acid –perchloric acid digestion. Section 3030-H prepared and published jointly by the American Public Health Association (APHA), the American Water Works Association (AWWA), and the Water Environment Federation (WEF). Edition 20th.
20. Tsao DT. (2003). Overview of phytotechnologies. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 78: 1–50.
21. Turner, M., Rust, R (1971): Effects of chromium on growth and mineral nutrition of soybeans. *Soil Science Society of American Proceedings* 35: 755-58.
22. Wallace, A. (1976). Some effects of chromium toxicity on bush bean plants grown in soil. *Journal Plant and Soil*, 471-473.