



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**INFLUENCIA DE LAS MICORRIZAS ARBUSCULARES EN
LA FITOEXTRACCIÓN CON GIRASOL EN SUELOS
CONTAMINADOS POR Pb Y Cd.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

PRESENTA:

VARGAS MUÑOZ GONZALO ADRIÁN

Directora de Tesis:

M. en C. Patricia Rivera García

Asesora:

Biol. Elvia García Santos



México, D.F.

Octubre 2013

Agradecimientos

A la FES Zaragoza por haberme dado la oportunidad de pertenecer a esta casa de estudios.

A la M. en C. María de Jesús Sánchez Colín† por haberme aceptado como alumno, por todos esos consejos, su cariño y esa sonrisa con la que siempre nos recibía.

A la M. en C. Patricia Rivera García por aceptar dirigirme, por su paciencia y asesoría en el análisis estadístico, por los jalones de orejas, discusiones y peleas durante la elaboración de esta tesis.

A Biól. Elvia García Santos por sus consejos y el apoyo brindado en el laboratorio.

A Biól. Angélica Elaine González Schaff por toda su ayuda y apoyo en el laboratorio durante esos momentos difíciles.

A la Dra. Esther Matiana García Amador por su asesoría en el laboratorio y las correcciones en la elaboración de este trabajo.

A los M. en C. Ramiro Ríos Gómez y M. en C. Bárbara Susana Lunas Rosales por sus sugerencias y correcciones en la elaboración de este trabajo.

Al M. en C. Armando Cervantes Sandoval porque de alguna manera me enseñó a pensar, por su valiosa ayuda en la elaboración del análisis estadístico y su interpretación.

Al Dr. Arcadio Monroy Ata y a Biól. Yolanda Maribel Flores Estrada por el apoyo y cariño brindado en el invernadero.

A Biól. Marisela Arteaga Mejía por sus acertados consejos y observaciones que contribuyeron al enriquecimiento de este trabajo.

A M. en C. Lourdes Castillo Granada responsable del laboratorio de espectroscopia de la FES Zaragoza por las lecturas de las muestras que ayudaron al enriquecimiento de este trabajo.

A Biól. Azahariel Ramírez García por su ayuda y sugerencias en la redacción de este trabajo.

A la Dra. Irma Gisela Nieto Castañeda, a los Dr. Carlos Castillejos Cruz, Biól. Mariano García Díaz, Biól. Eduardo Alberto Ehnis Duhne, Biól. Roberto Cristóbal Guzmán por todos esos conocimientos y enseñanzas que me dieron a lo largo de la carrera.

A mi amigo Marco Antonio Rojas por toda la ayuda brindada en el laboratorio y por esos momentos de locura en la facultad.

A mis compañeros de laboratorio de Microbiología de Suelo: Paulina, Nathalie, Anayelli, Elizabeth, Claudia, Lidia, Erick, Cesar, Pedro, Yuvani, Ricardo, Jaime y Fabián por todos sus consejos y ayuda durante los últimos semestres de la carrera y la elaboración de la tesis.

Al proyecto PAPIME PE204612 y a la SEP por los apoyos otorgados.

Dedicatoria

A mi madre Gonzala Muñoz Godínez una campeona de obstáculos que le puso la vida, por apoyarme siempre en mis metas, sueños y estudios en todo momento, pero sobre todo por creer en mí.

A mi hermana Dra. Susana Vargas Muñoz, a su esposo Dr. Rogelio Rodríguez Talavera y a mi sobrino Rogelio Gabriel Rodríguez Vargas por todo su cariño y apoyo en la culminación de este trabajo.

A mi hermana Griselda Vargas Muñoz, a mis sobrinos Griselda Argelia, Sayra Atenea y Tristán Argenis por toda su ayuda y cariño.

A mi hermana: Dora Vargas Muñoz, a su esposo Ernesto Samaniego Cedillo y al Caballero Rojo por todo su apoyo.

A mis amigos Carlos Francisco Madrigal y Ricardo Rodolfo Rojas Hernández por apoyarme en todas mis locuras, ayudarme en lo que me he propuesto y demostrarme cada día el término “amistad”.

A mis amigos Raúl Abraham Adon Negrete, José Jacinto Doroteo Carlos (Padawan), Pavel Armando Covarrubias Pérez, Ángel David Nava Beltrán y Reymon por toda su ayuda y sobre todo por esos duelos de Mitos y Leyendas en AnimeNote (Kuria’s Castle).

A mi nuevo amigo Alan Acuña quien me dio ánimos para seguir adelante en este trabajo y no sólo eso también compartimos una afición muy al estilo de Pretty Cure.

Dedication

To ^{つきじまさみ}築地昌実様 who from Japan helped me achieve my goals and dreams, by collaborate on the translations to finish this special page.

To ^{とうどう}東堂いづみ様、^{かみきたじつな}上北実那樣 and ^{かみきたきずな}上北希沙様 by create, illustrate and animate the wonderful series of Pretty Cure.

To ^{くどうまゆ}工藤真由様、^{いけだあや}池田彩様、^{ごじょうまゆみ}五條真由美様 and ^{ゆかうちやえ}友賀内八重様 by those beautiful songs to motivate me to keep going every day.

To ^{みすみ}美墨なぎさ、^{ゆきしろ}雪城ほのか、^{くじょう}九条ひかり、^{ひゆうがさき}日向咲、^{みしょうまい}美翔舞、^{ゆめはら}夢原のぞみ、
^{なつき}夏木りん、^{かすがの}春日野うらら、^{あきもと}秋元こまち、^{みなづき}水無月かれん、^{みみの}美々野くるみ、^{ももぞの}桃園ラブ、
^{あおのみき}蒼乃美希、^{やまぶき}山吹祈里、^{ひがし}東せつな、^{はなざき}花咲つぼみ、^{くるみ}来海えりか、^{つきかげ}月影ゆり、
^{みょうどういん}明堂院いつき、^{ほうじょう}北条響、^{ひびき}南野奏、^{みなみのかなで}黒川エレン、^{くろかわ}調辺アコ、^{しらべ}星空みゆき、
^{ひの}日野あかね、^{きせ}黄瀬やよい、^{みどりかわ}緑川なお、^{あおき}青木れいか、^{あいだ}相田マナ、^{ひしかわ}菱川りっか、
^{よつば}四葉ありす、^{けんざきまこと}剣崎真琴 and ^{まどかあぐり}円亜久里 for its endless adventures and strength of her heart.

To each and every one of the Pretty Cure series: ふたりはプリキュア、ふたりはプリキュア マックスハート、ふたりはプリキュア Splash☆Star、Yes!プリキュア5、Yes!プリキュア5 Go Go!、フレッシュプリキュア!、ハートキャッチプリキュア!、スイートプリキュア♪、スマイルプリキュア、ドキドキ!プリキュア。

To series like: ^{せいとうせいや}聖闘士星矢、^{びしょうじよせんし}美少女戦士セーラームーン、^{まほうきし}魔法騎士レイアース、キャンディ・キャンディ、^{ぴたテン}ぴたテン、^{けんしん}るろうに剣心 -^{めいじけんきやくろうまんたん}明治剣客浪漫譚、^{こうてつてんし}鋼鉄天使くるみ、^{つばさ}キャプテン翼、^{いえ}カードキャプターさくら、^こ家なき子、^{ほくと}アルプスの少女ハイジ、^{けん}北斗の拳 and あしたのジョー for teaching me that I should never give up to my dreams.

Esta dedicatoria especial es para la M. en C. María de Jesús Sánchez Colín† (Mami Chuy), por todo su cariño, pero sobre todo por haber sido como una madre para todos en el Laboratorio de Biología de Suelos.



Nunca he olvidado esas palabras que me dijo esa tarde Maestra:

“Recuerda hijo los últimos serán los primeros”, sólo espero haber llevado a buen término la elaboración de este trabajo y gracias por todo, donde quiera que esté.

はな たびだ みき のこ
花びらは旅立っても幹は残るよ

キラメキを種に托しては生命めぐる

ゆうき ひ つ
勇気をねギュッとキュッと引き継いだから

かなら つぎ シーズンさ み
必ずや次のseason咲いて見せるよ

リッスン め と みみ す
Listen。。。目を閉じて、耳を澄まして

リッスン かん
Listen。。。感じるつながるイノチ

きぼうインナーボイス
つたわる希望inner voice

ド・レ・ミ・ファ・空に la la la ハミング

めざ ちカラ
目覚めたしまうころの力

サ・シ・ス・セ・空ははればれ晴れやか

しあわ うた
幸せ歌うメロディーになろう

みんなの笑顔、みんなのキモチ

センキューフォーオール
Thank you for all。。。

ありがとうがいっぱい

ド・レ・ミ・ファ・空に la la la ハミング

け け
消すに消せないころのタカラ

カ・キ・ク・ケ・声をアゲアゲ上げよう↑

ゆめ かなで
夢を奏るリズムになろう

みんなの涙、みんなの背中

センキューフォーオール
Thank you for all。。。

ありがとうがいっぱい



みんな^{いま}今までも、そしてこれからも、ずっとずっとありがとう!!

ÍNDICE.....	vi
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ABSTRAC.....	1
RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS PARTICULARES.....	4
JUSTIFICACIÓN.....	4
HIPÓTESIS.....	4
Capítulo 1.- Definición de metales pesados.....	5
1.1.-Características de los metales pesados.....	5
1.2.-Efectos de los metales pesados en el suelo y las plantas.....	6
1.3.-Plomo.....	6
1.4.-Cadmio.....	7
Capítulo 2.- Remediación.....	8
2.1.-Biorremediación.....	9
2.2.-Fitorremediación.....	10
2.3.-Fitoextracción.....	12
2.4.-Función de las plantas en la fitoextracción.....	12
2.5.- Plantas hiperacumuladoras.....	13
2.6.- Girasol.....	14
Capítulo 3.- Micorrizas.....	16
3.1.-Características de las micorrizas.....	16
	vi

3.2.-Tipo de micorrizas.....	16
3.3.-Micorrizas arbusculares.....	16
3.4.-Efectos de las micorrizas arbusculares en las plantas.....	17
3.5.-Efectos de las micorrizas arbusculares en la fitoextracción.....	17
4.-Método.....	19
5.-Resultados.....	20
6.-Discusión.....	38
7.-Conclusiones.....	42
8.- Bibliografía.....	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Principales ventajas y desventajas de la fitorremediación	10
Cuadro 2.- Distribución de los tratamientos	22
Cuadro 3.- Condiciones de lectura de Pb y Cd según lo especificado por el fabricante	25
Cuadro 4.- Propiedades físicas y químicas del sustrato	27
Cuadro 5.- Porcentaje de germinación de las semillas de girasol a diferentes concentraciones de Pb y Cd	28
Cuadro 6.- Porcentaje de colonización total de las raíces de girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.) a diferentes concentraciones de Pb y Cd	29
Cuadro 7.- Valores de concentración en raíz de plantas de girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.) micorrizado (M) y no micorrizado (N) en suelo contaminado a diferentes concentraciones de Pb y Cd	30
Cuadro 8.- Prueba de rangos múltiples de la concentración de Pb (1 y 2) y Cd (3 y 4) en raíces de girasol	31
Cuadro 9.- Valores de concentración en parte aérea de plantas de girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.) micorrizado (M) y no micorrizado (N) en suelo contaminado a diferentes concentraciones de Pb y Cd	32
Cuadro 10.- Prueba de rangos múltiples de la concentración de Pb (1 y 2) y Cd (3 y 4) en parte aérea de girasol	33
Cuadro 11.- Valores de concentración en flor de girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.) micorrizado (M) y no micorrizado (N) en suelo contaminado a diferentes concentraciones de Pb y Cd	34
Cuadro 12.- Prueba de rangos múltiples de la concentración de Pb (1 y 2) y Cd (3 y 4) en flor de girasol	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Diagrama de flujo	19
Figura 2.- Zona de estudio donde se colectó el suelo	20
Figura 3.- Distribución de las macetas en el invernadero	21
Figura 4.- Montaje de las raíces teñidas para la cuantificación del porcentaje de colonización micorrízica	23
Figura 5.- Digestiones de las distintas partes de girasol	24
Figura 6.- Curva patrón de Pb	26
Figura 7.- Curva patrón de Cd	26
Figura 8.- Comparación de los tratamientos de Pb (1 y 2) y Cd (3 y 4) en raíces de girasol	31
Figura 9.- Comparación de los tratamientos de Pb (1 y 2) y Cd (3 y 4) en parte aérea de girasol	33
Figura 10.- Comparación de los tratamientos de Pb (1 y 2) y Cd (3 y 4) en flor de girasol	35
Figura 11.- Efecto del Pb en las flores de girasol	36
Figura 12.- Efecto del Cd en las flores de girasol	36
Figura 13.- Longitud de la raíz de girasol con y sin micorrizas a diferentes concentraciones de Pb.	37
Figura 14.- Longitud de la raíz de girasol con y sin micorrizas a diferentes concentraciones de Cd	37

Abstract

Anthropogenic activities such as industry have increased generation of heavy metals, for example the Pb and Cd to be non-essential elements cause various problems in ecosystems. Currently there are several biological techniques for the remediation of soils contaminated by heavy metals, such as phytoextraction, which involves the uptake and accumulation of heavy metals, hydrocarbons and radioactive elements in the aerial part of the plant. The sunflower (*Helianthus annuus*) can accumulate elements (Cr, Pb, Cs and U) in their roots, stems and leaves, also the arbuscular mycorrhizae like *Rhizophagus intraradices* provide the plant with the capacity to grow and tolerate high concentrations of pollutants, play an important role in the remediation of soils contaminated by heavy metals. In this study we evaluated the capacity for phytoextraction of sunflower inoculated with *Rhizophagus intraradices* which were planted in pots with a mixture of soil and agrolite v / v 1:1, became contaminated artificially with 0, 400, 800 and 1000 mg·kg⁻¹ Pb and 0, 37, 60 and 120 mg·kg⁻¹ Cd. For each treatment were placed 2 seeds per pot with 5 replicates under greenhouse conditions. Sunflower average germination was 56 to 64% in Pb and a 48 to 60% in Cd, the percentage of mycorrhizal colonization was 50 to 76% in Cd and a 42 to 60% in Pb. The concentrations of Pb and Cd in root, aerial part and flower were determined by atomic absorption spectrophotometer, the results show that the addition of arbuscular mycorrhizae presented significant statistical differences ($\alpha < 0.005$) regarding treatment of non mycorrhized Pb in different parts of the plant. In the case of Cd are not presented significant statistical differences for any part of the plant. These results prove that the sunflower has capacity for phytoextraction of Pb. In presence of Cd show malformations to flower level, the sunflower seed has the ability to germinate at high concentrations of Pb and Cd, the addition of arbuscular mycorrhizae is a biological alternative in the phytoextraction of soils contaminated by Pb.

Resumen

Las actividades antropogénicas, como la industria, han incrementado la generación de metales pesados, por ejemplo el Pb y Cd que al ser elementos no esenciales ocasionan diversos problemas en los ecosistemas. Actualmente existen diversas técnicas biológicas para la remediación de suelos contaminados por metales pesados, como la fitoextracción, que consiste en la absorción y acumulación de metales pesados, hidrocarburos y elementos radiactivos, en la parte aérea de la planta. El girasol (*Helianthus annuus* L.) puede acumular elementos (Cr, Pb, Cs y U) en sus raíces, tallos y hojas; asimismo, las micorrizas arbusculares como *Rizophagus intraradices* brindan a la planta la capacidad de crecer y tolerar altas concentraciones de contaminantes, desempeñando un papel importante en la remediación de suelos contaminados por metales pesados. En este trabajo se evaluó la capacidad fitoextractora del girasol al inocularlo con *Rizophagus intraradices*, que fueron sembradas en macetas con una mezcla de suelo y agrolita v/v 1:1, contaminado artificialmente con 0, 400, 800 y 1000 mg·kg⁻¹ de Pb y 0, 37, 60 y 120 mg·kg⁻¹ de Cd. Para cada tratamiento se colocaron, bajo condiciones de invernadero, 2 semillas por maceta con 5 repeticiones. La germinación promedio del girasol fue de 56 al 64% en Pb y del 48 al 60% en Cd, el porcentaje de colonización micorrízica fue del 50 al 76% en Cd y del 42 al 60% en Pb. Las concentraciones de Pb y Cd en raíz, parte aérea y flor, se determinaron en un espectrofotómetro de absorción atómica. Los resultados demuestran que la adición de micorrizas arbusculares presentó diferencias estadísticas significativas ($\alpha < 0.005$) con respecto al tratamiento no micorrizado de Pb en las distintas partes de la planta. En el caso del Cd no se presentan diferencias estadísticas significativas para ninguna parte de la planta. Estos resultados demuestran que el girasol tiene capacidad fitoextractora para el Pb, y en presencia de Cd presenta malformaciones a nivel de flor. La semilla de girasol tiene la capacidad de germinar a elevadas concentraciones de Pb y Cd, la adición de micorrizas arbusculares es una alternativa biológica en la fitoextracción de suelos contaminados por Pb.

Introducción

La contaminación del suelo por metales pesados es el resultado de diversas actividades antropogénicas como la minería, el uso de fertilizantes entre otros, esto representa un problema debido a que estos metales pueden acumularse con facilidad persistiendo en el ambiente por miles de años ocasionando alteraciones en los ecosistemas terrestres y acuáticos (Aydinalp y Marinova, 2009).

Ante esta problemática existen alternativas biológicas como la fitorremediación que hacen uso de plantas que tienen la capacidad de tolerar, absorber y acumular a los metales pesados de una manera no tóxica para la planta en diversas partes de su tejido como raíz, tallo y hoja, como las plantas hiperacumuladoras que son capaces de absorber de 10 a 100 veces las concentraciones normales (Kidd y col., 2007).

La importancia de las micorrizas arbusculares en la remediación de suelos contaminados por metales pesados consiste en que tiene efectos benéficos como, la inmovilización de los metales en la raíz, reduciendo la translocación hacia la parte aérea de la planta, evitando así el ingreso de los metales pesados en la cadena trófica (Guerra, 2008).

El uso del girasol como planta fitoextractora en asociación a micorrizas arbusculares es reciente, diversos autores como Awotoye y col., (2009) y Adewole y col., (2010) han reportado estas capacidades fitoextractoras principalmente para Pb, sin embargo, para el caso de Cd son escasos los estudios de fitoextracción que van más enfocados a los efectos tóxicos de Cd en plantas (Jin y col., 2008).

En el presente trabajo se ha usado el girasol (*Helianthus annuus* L.) por ser una planta acumuladora de Pb, por su capacidad de generar gran cantidad de biomasa, se relacionó con *Rizophagus intraradices* por su capacidad de absorber y acumular este metal, las diferencias están presentes en el tratamiento de Pb a nivel de raíz y flor principalmente, en el caso del Cd sólo se detectaron efectos de alteraciones morfológicas a nivel de flor y las concentraciones de Cd se observaron más en la raíz y parte aérea de la planta.

Objetivo General

Evaluar la capacidad fitoextractora del girasol (*Helianthus annuus* L.) asociada con micorrizas arbusculares en un suelo contaminado por Pb y Cd a nivel de invernadero, como una alternativa para la remediación de suelo contaminado por metales pesados.

Objetivos particulares

- Determinar la concentración de Pb y Cd en las distintas partes de la planta (raíz, parte aérea y flor) por espectrofotometría de absorción atómica.
- Evaluar los efectos del Pb y Cd en las distintas partes de la planta.
- Cuantificar el % de colonización micorrízica.

Justificación

Existen diversas técnicas para la remediación de suelos contaminados sin embargo, estas alteran de manera significativa sus características físicas, químicas y biológicas e implican un alto costo económico. Este trabajo pretende con el uso del girasol (*Helianthus annuus* L.) utilizar una alternativa más amigable, económica, para lograr una remediación del suelo de una manera más ecológica, ya que esta planta tiene un potencial fitorremediador muy alto (hiperacumuladora), su asociación con micorrizas arbusculares contribuirán a una mayor absorción de Pb y Cd evitando así la posible lixiviación de estos elementos hacia los mantos freáticos y su posterior ingreso en los seres vivos.

Hipótesis

El girasol (*Helianthus annuus* L.) tiene gran capacidad hiperacumuladora en raíces, la inoculación de estas con micorrizas arbusculares (*Rhizophagus intraradices*) incrementará su capacidad fitorremediadora para la absorción de Pb y Cd.

Para abordar la problemática de la remediación de suelos por metales pesados se planteó el siguiente capitulado: el capítulo uno explicará que son los metales pesados, sus características y sus efectos, el capítulo dos dónde se tratará el tema de la fitoextracción y la función de las plantas hiperacumuladoras como el girasol en esta biotecnología y por último el capítulo tres que explicará que son las micorrizas arbusculares y sus efectos en la fitoextracción de metales pesados como el Pb y Cd.

Capítulo I

Contaminación del suelo por metales pesados

Como consecuencia de la revolución industrial se incrementó la dispersión de contaminantes en el suelo, agua y atmosfera; de ellos el suelo al ser un medio semiestático va acumulando los contaminantes inorgánicos como los metales pesados que permanecen por mucho más tiempo al no poder ser degradados (Becerril y col., 2007).

La contaminación del suelo se define como la presencia de uno o más elementos o residuos tóxicos, que dañan de manera significativa las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, los ecosistemas y los organismos que los habitan, de esta manera la contaminación antrópica del suelo aparece cuando una sustancia está presente a concentración superior a sus niveles naturales, y tiene un impacto negativo en alguno o todos los constituyentes del mismo (Ortega y col., 2009).

Wong, (2003) reporta que los suelos contaminados presentan los siguientes efectos:

- I) Eliminación de los procesos naturales restauradores del suelo.
- II) Disminución en la diversidad de la microfauna del suelo.
- III) Reducción de la fertilidad, así como la posible alteración en la composición del cultivo al entrar en la cadena trófica.
- IV) Ausencia inicial de vegetación.
- V) Contaminación de sistemas lóticos, lénticos y del manto freático.

1.1.-Características de los metales pesados

Los metales pesados se definen como aquellos elementos químicos que tienen una densidad mayor o igual a 5 g cm^{-3} o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalinotérreos). Su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0,1% y casi siempre menor del 0,01% (Navarro y col., 2007).

Estos elementos están presentes en el suelo y plantas en bajas concentraciones, algunos de ellos son esenciales para el desarrollo y crecimiento de los seres vivos pero, también pueden ser tóxicos si superan cierto umbral, o si se ingieren o inhalan en altas concentraciones durante prolongados periodos de tiempo, de todos los metales pesados se consideran tóxicos a 17 de ellos por su gran capacidad de acumulación, estos son: Ag, As, Bi, Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Pb, Pd, Pt, Sb, Se, Sn, Te, Tl y Zn (Galán y Romero, 2008).

1.2.-Efectos de los metales pesados en los seres vivos

El peligro que los metales pesados representan en el suelo es que al ser elementos tóxicos pueden acumularse e integrarse a la red trófica y a los ciclos biológicos, químicos y geológicos (Balderas y col., 2003), el daño ocasionado por los metales pesados en los seres vivos van desde afectación al ADN, mutaciones y efectos cancerígenos (Hooda, 2007). Por ejemplo el envenenamiento por Pb provoca daño neurológico que ocasiona pérdida de memoria, inteligencia reducida, problemas de coordinación y de aprendizaje, el Arsénico ocasiona cáncer en la piel, problemas cardiovasculares, daño renal y neuropatía periférica y el Cd está asociado a diversas enfermedades renales (Prahba y Loretta, 2007).

1.3.-Plomo

El plomo en forma natural en la corteza terrestre se encuentra como un metal gris azulino, es empleado en la fabricación de acumuladores, pintura, forros para cables, cerámicas, vidrios especiales, soldadura, pigmentos y municiones, además es tóxico para la salud, ya que afecta principalmente el sistema nervioso y es asociado con la depresión de muchas funciones endocrinas (Rodríguez y col., 2006).

En las plantas los principales síntomas de toxicidad por Pb son: inhibición en el crecimiento de la raíz, disminución en el crecimiento de la planta y clorosis, en seres humanos al ser ingerido, inhalado o absorbido en niveles de 10 a 100 µg/dL, resulta tóxico para los sistemas endocrino, cardiovascular, respiratorio, inmunológico, neurológico y gastrointestinal, así mismo afecta la piel y los riñones (Alvarado y col., 2011).

1.4.-Cadmio

El Cd es un metal que pertenece al grupo IIB de la tabla periódica de los elementos químicos, está presente en la naturaleza como resultado de erupciones volcánicas, quemadas forestales, minería, fundición de metales, quemadas de combustibles fósiles, uso de fertilizantes fosfatados, fabricación de baterías, pigmentos y plásticos (Pernía y col., 2008).

Diversos factores físicos, químicos y biológicos influyen en la disponibilidad del cadmio para la planta como son el pH del suelo, la temperatura, la materia orgánica, el agua y el contenido de arcillas (Christensen y Haug, 1999).

Los efectos tóxicos del Cadmio en las plantas son: interferencia en la entrada, transporte y uso de elementos esenciales (Ca, Mg, P y K), estrés hídrico, reduce la absorción de nitratos y clorosis producto de la deficiencia de Hierro (Rodríguez y col., 2008).

Capítulo II

Remediación

La remediación del suelo se define como una serie de técnicas capaces de eliminar, degradar o contener los contaminantes del suelo. Existen diversos procesos de remediación, que pueden ser *in situ* o *ex situ*, así como tipo de tratamiento para el uso de la tecnología de remediación que pueden ser de tipo biológico (uso de plantas, hongos, bacterias, nemátodos entre otros), físico, químico (empleando sus propiedades físicas y químicas para la contención, eliminación o dispersión del contaminante), térmico (empleando el uso del calor para la degradación y volatilización de los contaminantes) y de extracción (Volke y Velasco, 2002).

Para emplear una tecnología de remediación de suelos capaz de alterar, remover y eliminar completamente el material contaminante, dependerá de la naturaleza del contaminante y sus propiedades físico-químicas (Lenoir y Tornari, 2004).

Las técnicas de remediación de acuerdo a Volke y col., (2005), se dividen en 5 tipos: i) extracción, ii) químicas, iii) físicas, iv) térmicas, v) biológicas.

i) Técnicas de extracción

Lavado de suelo.- (*in situ*) desprende y atenúa el contaminante en función de su solubilidad y del tipo de químico empleado.

Aplicación de Vacío.- (*in situ*) para destruir compuestos orgánicos y elementos como el mercurio.

ii) Técnicas químicas

Oxidación.- agregar elementos oxidantes para desintoxicar e inhibir los contaminantes del suelo.

Deshalogenación.- es la transformación que sufren los contaminantes halógenos al desintoxicarse.

iii) Técnicas físicas

a.- Contención- Emplean técnicas de cobertura y barrera verticales u horizontales, de este modo el contaminante no se mezcla con el medio ambiente.

b.- Solidificación- Emplean técnicas como encapsulación de polímeros, mezcla de cemento y vitrificación logrando precipitar el contaminante mediante el uso de agentes y así disminuir la solubilidad y el área de contaminación.

El principal problema al emplear estas técnicas son la generación de residuos que pueden producir nuevos contaminantes al ambiente.

iv) Técnicas Térmicas

Consisten en adicionar calor para destruir y evaporar los contaminantes presentes en el suelo.

v) Técnicas Biológicas

a) Degradación enzimática.- las enzimas degradan y eliminan las sustancias del sitio contaminado.

b) Remedación microbiana.- Se emplean microorganismos naturales o modificados genéticamente, en el sitio contaminado.

c) Fitorremediación.- Las plantas restauran los ecosistemas contaminados, debido a la presencia de especies vegetales que toleran, absorben y acumulan contaminantes en altas concentraciones (como metales pesados, hidrocarburos, compuestos orgánicos y radiactivos).

2.1.-Biorremediación

La biorremediación es una tecnología biológica que consiste en el uso de bacterias, hongos o plantas para neutralizar sustancias tóxicas, transformándolas en inocuas para el ambiente y la salud humana, puede clasificarse de acuerdo al organismo que efectuó la degradación o inmovilización del compuesto, siendo las bacterias las más empleadas en dicho proceso, aunque también se emplean otros organismos como los hongos, algas, cianobacterias para el tratamiento de compuestos tóxicos en el suelo y el agua tales como: plaguicidas, hidrocarburos, metales pesados y sustancias radiactivas (González, 2005).

A continuación se presenta un cuadro que muestra las ventajas y desventajas que tiene la fitorremediación.

Cuadro 1.- Principales ventajas y desventajas de la fitorremediación. Tomado y modificado de: (Manacorda y Cuadros, 2005).

Ventajas	Desventajas
Es una tecnología sustentable.	Requieren mucho tiempo.
Sirve para el tratamiento de múltiples tipos de contaminación.	Depende de las estaciones.
Se puede emplear en zonas con bajas o moderadas concentraciones de contaminantes.	Está condicionado por las concentraciones del contaminante.
Es económica ya que emplea la luz solar como fuente de energía.	La acumulación de contaminantes en las hojas puede volver nuevamente al suelo en otoño.
Es amigable, estética y ecológica con el ambiente.	Los contaminantes se acumulan en maderas y pueden liberarse por combustión.
Se evitan lugares de desecho ya que no produce contaminantes secundarios.	No todas las especies de plantas acumulan o toleran los contaminantes.
Evita la excavación y translocación del suelo.	Se puede incrementar la solubilidad de diversos contaminantes, pudiendo resultar un daño ambiental excesivo.
Presenta versatilidad para tratar diferentes materiales peligrosos.	Requieren de amplias zonas.
Reciclan recursos (agua, biomasa y metales)	
El proceso de descontaminación es más rápido que de manera natural.	

2.2.-Fitorremediación

La fitorremediación es una tecnología biológica que emplea plantas para la remoción, degradación o inmovilización del contaminante, ubicados en suelos, sedimentos y aguas superficiales o someras, de esta forma diversas especies se pueden usar para tratar gran cantidad de contaminantes como los metales pesados, hidrocarburos y elementos radiactivos.

Los criterios de selección de la especie para aplicar una de las distintos tipos de fitorremediación deben tomar en cuenta características tales como: tolerancia al contaminante, tipo de enzimas degradativas que producen, tipo de crecimiento radicular, potencial de evapotranspiración, capacidad de bioacumular e inmovilizar el contaminante (Larenas y De Viana, 2005).

Tipos de Fitorremediación

Hong y Cutright, (2001), reportan que dependiendo de la cantidad o nivel de contaminación por metales pesados se puede aplicar una de las 6 diferentes estrategias de la fitorremediación basadas en los mecanismos que tienen las plantas para la remoción de contaminantes.

- i. La fitodegradación se refiere al hecho de disminuir la toxicidad de los contaminantes a través de las interacciones y reacciones enzimáticas llevadas a cabo en la rizosfera para que a su vez sean asimilados, secuestrados y fijados en las estructuras de las plantas
- ii. La fitoestimulación; en este caso la planta aporta nutrimentos desde la parte superior hasta la rizosfera lo que beneficia el crecimiento de hongos y bacterias que se encargan de la mineralización de los contaminantes.
- iii. La fitovolatilización: es un proceso en el cual la planta puede volatilizar ciertos contaminantes presentes en el suelo, que se absorben, metabolizan, transportan y se liberan en forma gaseosa que es menos dañina que en su forma oxidativa, esto se lleva a cabo en la raíz y se elimina con la evapotranspiración.
- iv. La fitoestabilización es un proceso el cual fija metales pesados mediante reacciones químicas y adsorción en las raíces densas que los secuestran, lignifican o humifican, esto gracias al control de la humedad en la zona contaminada evitando con esto la migración de los contaminantes hacia los mantos freáticos.
- v. La fitoextracción es un proceso mediante el cual las plantas acumulan los contaminantes en las raíces, tallos y hojas.
- vi. La rizofiltración: a través de cultivos hidropónicos se logra el desarrollo de raíces de plantas con la capacidad de absorber, sedimentar y solidificar los metales pesados.

2.3.-Fitoextracción

La fitoextracción es una tecnología ambiental que emplea la capacidad de diversas especies de plantas para acumular ciertos contaminantes como los metales pesados, a través de las raíces y así translocarlos hacia las partes aéreas de la planta para su posterior cosecha, eliminando de esta manera el contaminante (Chhotu y Fulekar, 2009; Porębska y Ostrowska, 1999).

Pero solo puede ser empleada cuando el nivel de contaminante biodisponible es moderadamente alto y se puede reducir por debajo del valor ambientalmente aceptable, por lo tanto es la mejor alternativa para la eliminación de metales pesados de modo que no altere la fertilidad y la estructura del suelo, con la finalidad de hacer esta tecnología más eficaz, las plantas deben extraer grandes cantidades de metales pesados y producir gran cantidad de biomasa (Gosh y Singh, 2005; Vashegy y col., 2005).

Así, la fitoextracción se puede repetir hasta que se reduzca la concentración de metales pesados en el suelo y estén dentro de los límites permisibles, algunas especies de plantas empleadas en esta biotecnología son: *Thlaspi caerulescens* (Cd), *Brassica juncea*, *Helianthus annuus*, *Sesbania drummondii* (Pb), *Alyssum murale*, *Trifolium nigriscens*, *Psychotria dovarrei*, *Geissois pruinosa*, *Pimelea leptospermoides* y *Aeollanthus biformifolius* (Ni); *Sedum alfredii*, *Viola baoshanensis* y *Vertiveria zizanooides* (Zn, Cd, Pb); *Brassica napus* (Cu, Pb, Zn); y *Pistia stratiotes* (Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn) (Delgadillo y col., 2011).

2.4.-Función de las plantas en la fitoextracción

Las plantas han desarrollado mecanismos para extraer, transportar y utilizar los micronutrientes del suelo, además en la naturaleza existe una gran diversidad de plantas capaces de tolerar, acumular y extraer altas concentraciones de metales pesados en las distintas partes de sus tejidos, estabilizándolos mediante la formación de compuestos o acumulándolos en la pared celular y vacuola, sin presentar efectos tóxicos para la planta (Cutright y col., 2008; Gutiérrez y col., 2011).

Este proceso evolutivo de crecer y desarrollarse en ambientes con elevadas concentraciones de metales pesados le ha permitido a las plantas desarrollar la capacidad de tolerar, esta tolerancia se clasifica en dos tipos dependiendo de los mecanismos bioquímicos o moleculares que presenten: la co-tolerancia como resultado de un mecanismo específico que brinda a la planta tolerar diversos metales y la tolerancia múltiple que es generada por una serie de mecanismos independientes para cada metal interactuando de manera conjunta para evitar daño en la planta, esto ha permitido que las plantas hayan desarrollado tres estrategias básicas para su establecimiento en suelos contaminados por metales pesados: exclusión, indicación e hiperacumulación (González y Zapata, 2008).

2.5.-Plantas hiperacumuladoras

El término hiperacumuladora se designa a aquellas plantas capaces de acumular $> 1.000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Pb y $>100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Cd en materia seca de algún tejido de su biomasa, alcanzado así concentraciones de metales de 10 a 100 veces las concentraciones normales (Kidd y col., 2007), se trata de 415 especies incluidas en 45 familias botánicas con capacidad para acumular selectivamente diferentes metales, en tres tipos de mecanismos fisiológicos: acumulación, indicación y exclusión, permitiéndole a la planta tolerar altas concentraciones de metales pesados que serían nocivas para otras especies vegetales (Marrero y col., 2012).

No obstante este tipo de plantas presentan baja tasa de crecimiento, mínima producción de biomasa y un sistema radicular bajo, debido al costo energético que tiene la planta al acumular concentraciones de metales en su interior que exceden valores como el 1% de su peso seco (Llugany y col., 2007).

Plantas como el maíz (*Zea maíz*), la mostaza (*Brassica juncea*) y el girasol (*Helianthus annuus* L.) muestran gran tolerancia a los sitios contaminados por metales pesados, producen gran cantidad de biomasa lo que les permite la extracción y acumulación de grandes cantidades de contaminantes (Angelova y col. 2012).

2.6.- Girasol

Información Taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Helianthus* L. 1753

Especie: *annuus* L. 1753

Descripción técnica

Basada en Rzedowski y Rzedowski, 2008.

Hábito y forma de vida: Planta anual.

Tamaño: De hasta 3 m de alto.

Tallo: Erecto simple o ramificado, por lo general toscamente hispido.

Hojas: En su mayoría alternas, con pecíolos de hasta 20 cm de largo, lámina ovada a triangular-ovada o anchamente lanceolada, hasta 45 cm de largo y 35 cm de ancho (aunque hay plantas silvestres por lo común de menos de la mitad de este tamaño), obtusa a acuminada en el ápice, toscamente aserrada a subentera en el margen, cuneada a acorazonada en la base, por lo común escábrida (áspera) hispida en ambas caras, trinervada.

Cabezuela/Flores: Cabezuelas solitarias o agrupadas por varias en el extremo de los tallos; involucreo hemisférico, de más de 2 cm de diámetro, sus brácteas ± 25 (o más en las formas cultivadas) ovadas o anchamente lanceoladas, acuminadas en el ápice, casi siempre hispidas o hirsutas; receptáculo plano, páleas lanceoladas, profundamente 3-cuspidadas; flores liguladas 8 o más, sus láminas oblongas u oblanceoladas, amarillas a anaranjadas, hasta 5 cm de largo; flores del disco en general más de 200, sus corolas a menudo oscuras en la parte apical, ± 7 mm de largo.

Frutos y semillas: Aquenios oblongo ovoides, algo comprimidos, 3,5 a 5.5 (16) mm de largo, grisáceo, a menudo moteado; vilano de dos escamas lanceoladas, caducas.

El cultivo de girasol va enfocado principalmente a la obtención de semillas que se utilizan para la obtención de aceite vegetal comestible (Luevanos y col., 2010), también para consumo humano y la obtención de harina para hornear pan, como alimento para aves y ganado, las flores se emplean para la extracción de un tinte y las plantas se usan como forraje, abono verde o para fines ornamentales (CFIA, 2005), la superficie cultivada es de aproximadamente 26 millones de hectáreas con una producción de 28 millones de toneladas (Arshad y col., 2010), en México la distribución del girasol se registra desde el norte del país hasta la península de Yucatán (Mendoza y col., 2006).

El girasol ha demostrado ser una planta con un potencial fitoextractor útil en la remediación de suelos contaminados por Pb, Cr, Cd, Cu y elementos radiactivos (Rodríguez y col., 2006), por su alta producción de biomasa, ser una planta de rápido crecimiento y presentar capacidad de tolerar, crecer y absorber los metales pesados en sus raíces (Ullah y col., 2011).

Capítulo III

Micorrizas

3.1.-Características de las micorrizas

La asociación simbiótica mutualista de las raíces de las plantas y ciertas especies de hongos del suelo reciben el nombre de micorrizas. Esto ha sido objeto de diversos estudios llegando a determinar que estas juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Pereira y col., 2001).

Entre los beneficios que aportan las micorrizas están la promoción del crecimiento vegetal y mejoramiento en la asimilación de nutrimentos, esta interacción planta-hongo ha logrado desarrollar características de tolerancia en la planta lo que le permite absorber, distribuir y acumular metales pesados en las raíces y en los brotes, desempeñando un papel importante en remediación de suelos contaminados por metales pesados (Liao y col., 2003; Sudová y col., 2007).

3.2.-Tipo de micorrizas

Aguilera y col. (2007-2008), reconocen 5 tipos de micorrizas basados en criterios morfológicos, sistemáticos y anatómicos de plantas y hongos; estos tipos son: ectomicorrizas, endomicorrizas también llamadas micorrizas arbusculares, micorrizas de ericales, micorrizas de Orchidaceae y ectoendomicorrizas, de estas la asociación más extendida es la de las micorrizas arbusculares, formada por ciertos Zigomicetos, los cuales no desarrollan red de Harting porque colonizan intracelularmente la corteza de la raíz por medio de estructuras llamadas arbuscúlos que son los encargados del intercambio de nutrimentos entre la planta y el huésped; algunas de estas especies desarrollan otra estructura llamada vesícula compuesta principalmente por lípidos y que tienen la función de reserva de nutrimentos para el hongo.

3.3.-Micorrizas arbusculares

Las micorrizas arbusculares forman asociaciones mutualistas dadas por cierto tipo de hongos y un 80-95% de las plantas que tienen raíces afines a este tipo de unión (Aguilera y col., 2008). Esta simbiosis se realiza a nivel de raíz con la colonización intracelular de la corteza por medio de arbuscúlos que son los encargados del intercambio de carbono, fósforo y otros elementos para la nutrición del hongo y la planta (Cuenca y col., 2007).

Asimismo la obtención de nutrimentos es más notoria cuando la planta está bajo condiciones adversas de crecimiento en suelos contaminados por plomo, gracias a esto las plantas micorrizadas muestran una mayor captación de metales en la raíz elevando el flujo de estos hacia la parte aérea de la planta (Aguilera y col., 2007-2008).

3.4.-Efectos de las micorrizas arbusculares en las plantas

En los ecosistemas naturales la contribución de las micorrizas arbusculares es conocida por mejorar el crecimiento de las plantas en suelos pobres en nutrimentos, inmovilizando los metales pesados en el suelo, ayudando a las plantas a tolerar altas concentraciones de metales pesados y mejorando su bioacumulación, evitando la toxicidad de la planta en suelos contaminados por metales pesados (Al-Ghamdi y col., 2012; Ching y col., 2007; Diaz y Garza, 2006).

Por lo tanto las plantas en asociación con los hongos formadores de micorrizas arbusculares tienen potencial, para acumular los metales pesados en las raíces y translocarlos a la parte aérea, favoreciendo de este modo la fitoextracción del metal. Existen diversas especies de hongos formadores de micorrizas que pueden tolerar y desarrollarse en suelos contaminados por metales pesados como: *Eutrophosphora spp.*, *Gigaspora spp.* y *Glomus spp.* (Batista y Sánchez, 2009).

3.5.-Efectos de las micorrizas arbusculares en la fitoextracción

Las micorrizas arbusculares se reproducen en casi todos los hábitats y climas, incluyendo suelos contaminados por metales pesados, es en este tipo de suelos que se producen cambios en la diversidad de las poblaciones de las micorrizas arbusculares, esto es grave debido a la interacción de las micorrizas arbusculares en el establecimiento de la planta y su supervivencia, así mismo las altas concentraciones de metales pesados interfieren en los procesos simbióticos de las micorrizas arbusculares tales como: retraso, reducción e incluso la eliminación de la germinación de esporas, además de alterar la colonización de las raíces de las plantas (Del Val y col., 1999).

De este modo las micorrizas arbusculares como *Rhizophagus intraradices* han presentado mayor tolerancia a metales como el Cd y Pb; y en simbiosis con la planta acumula una mayor concentración de metal en la raíz micorrizada con este hongo (Alvarado y col., 2011), y también esta influencia es notoria en la captación de ^{134}Cs con girasol, ya que incrementó la captación de este elemento radiactivo hasta 5 veces (Dubchack y col., 2010). Esta asociación de las plantas con micorrizas puede ser una alternativa para la remediación de suelos contaminados, ya que disminuyen el estrés y favorecen el crecimiento de las plantas en suelos contaminados por Pb y Cd sirviendo así como auxiliares en la restauración de los mismos (Ortiz y col., 2009).

Por ello la importancia de las micorrizas arbusculares en la fitorremediación de suelos contaminados, ya que tienen un efecto benéfico, inmovilizando los metales en la raíz, reduciendo la translocación a la parte aérea de la planta, logrando así subsistir en suelos altamente contaminados por metales pesados (Guerra, 2008).

Método

El trabajo se desarrolló de acuerdo al siguiente diagrama de flujo

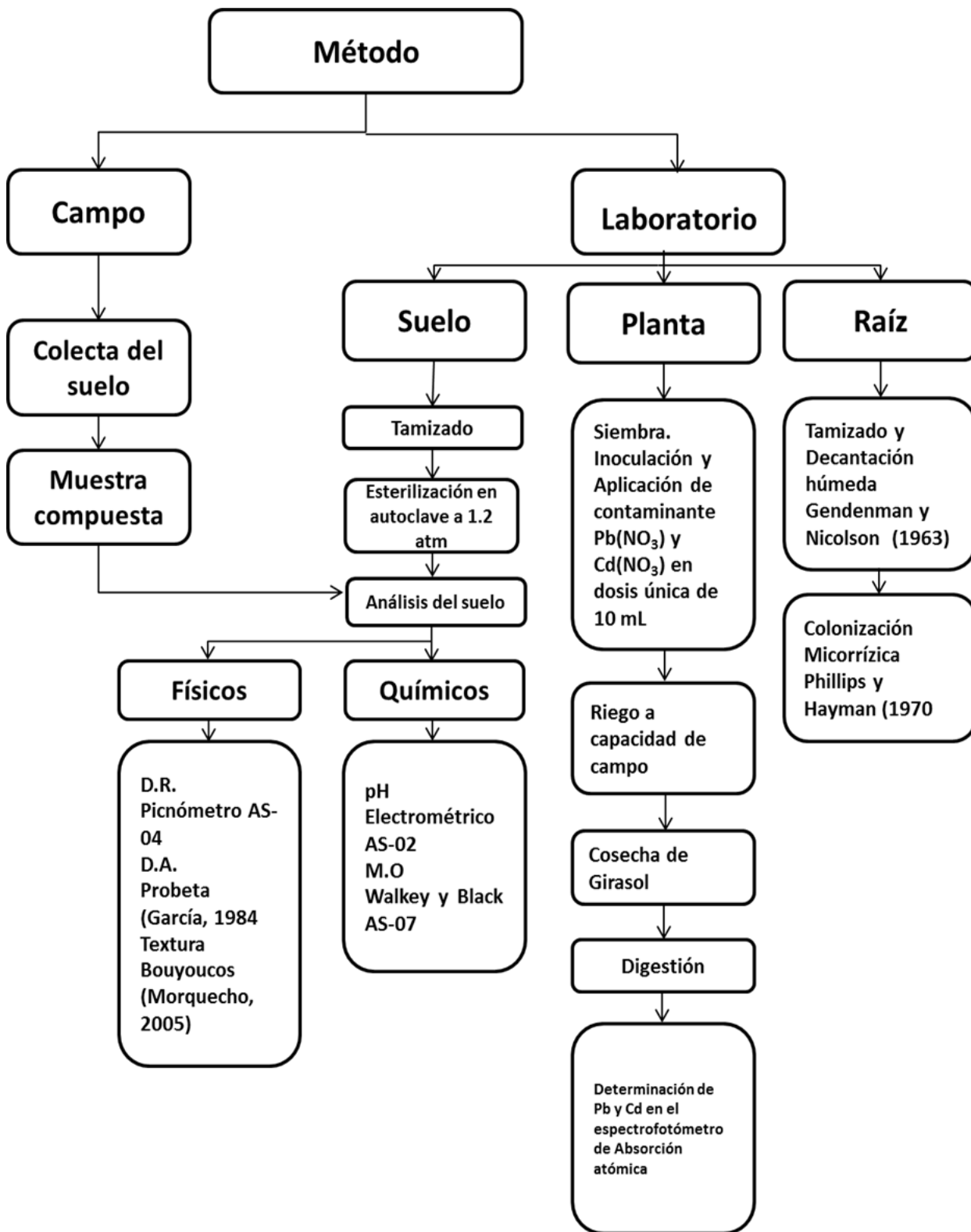


Figura 1.- Diagrama de flujo.

Fase de Campo

Las muestras de suelo fueron colectadas en parcelas de San Pedro Nexapa, municipio de Amecameca, Estado de México. Ubicadas en las coordenadas 19° 04' 755" Lat. N y 98° 43' 148" Long. W a 2768 msnm.

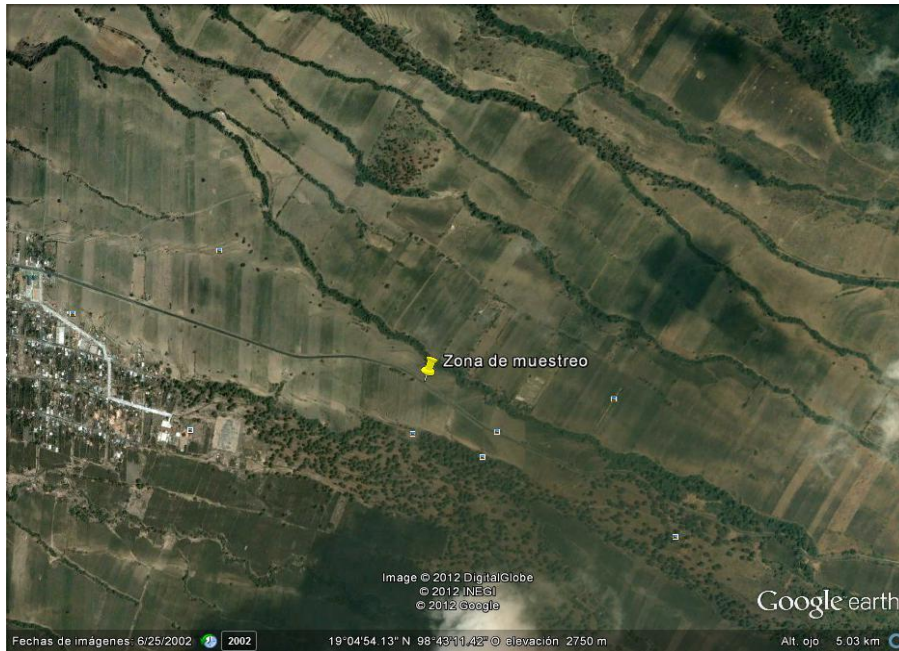


Figura 2.- Zona de estudio donde se colectó el suelo.

Fase de Laboratorio

El suelo se tamizó con una malla de 2 mm., después se realizó una mezcla con agrolita 1:1, y posteriormente se esterilizó con vapor en autoclave a 1.2 atm de presión por un periodo de 3 horas, con la finalidad de eliminar patógenos, microorganismos y posibles esporas de micorrizas nativas.

Las semillas se adquirieron en el mercado de Ozumba de Alzate, Estado de México. Se procedió a la limpieza de estas en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 10 minutos, realizándose además tres lavados con agua destilada estéril, para eliminar patógenos e impurezas en las semillas.

El suelo se contaminó artificialmente con cuatro dosis de Pb: 0 (testigo), 400, 800 y 1000 mg·kg⁻¹ de Pb y cuatro dosis de Cd: 0 (testigo), 37, 60 y 120 mg·kg⁻¹ de Cd. Las dosis de 400 mg·kg⁻¹ de Pb y 37 mg·kg⁻¹ de Cd respectivamente se consideran, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, como concentraciones que están en el límite de la contaminación del suelo por metales pesados para uso agrícola.

La siembra se llevó a cabo de manera directa depositando 2 semillas de girasol en bolsas de plástico negras (macetas) con capacidad de 3 kg de suelo; el sustrato fue preparado con una mezcla de suelo con agrolita 1:1, posteriormente se adicionó 10 mg. de *Rhizophagus intraradices* para su inoculación y se adicionaron las dosis de contaminantes Pb(NO₃) y Cd(NO₃) en dosis única de 10 mL. Las plantas fueron regadas a capacidad de campo cada tres días (200 mL de agua por maceta) para evitar el estrés hídrico.



Fig. 3.- Distribución de las macetas en el invernadero

El trabajo se distribuyó al azar en 80 unidades experimentales, con 8 tratamientos y 5 repeticiones por cada metal Plomo y Cadmio (fig. 3). En el cuadro 2 se presenta las concentraciones de cada tratamiento.

Cuadro 2.- Distribución de los tratamientos.

Tratamientos Micorrizados	Concentración (mg·kg⁻¹)	Tratamientos no Micorrizados	Concentración (mg·kg⁻¹)
T1+	0	T1	0
T2+	400 Pb	T2	400 Pb
T3+	800 Pb	T3	800 Pb
T4+	1000 Pb	T4	1000 Pb
T5+	0	T5	0
T6+	37 Cd	T6	37 Cd
T7+	60 Cd	T7	60 Cd
T8+	120 Cd	T8	120 Cd

El porcentaje de colonización micorrízica se evaluó siguiendo el método de Phillips y Hayman, (1970); las raíces lavadas se colocaron en frascos limpios y se les adicionó KOH al 10%, posteriormente se procedió a calentar en horno de microondas durante 3 minutos (clareo), el KOH se retiró y las raíces se enjuagaron con agua destilada, posteriormente se agregó H₂O₂ al 10% durante 3 minutos, pasado ese tiempo se procedió a enjuagar con agua destilada (blanqueo).

Las raíces se cubrieron con HCl al 10% por tres minutos, se eliminó el ácido y sin enjuagar se procedió a la tinción (acidificación). Los frascos que contienen a las raíces se cubrieron con la solución colorante (azul tripano 0.05% en lactoglicerol) y se calentaron durante 3 minutos en horno de microondas (tinción).

Para determinar el porcentaje de colonización micorrízica en raíces se procedió a su montaje en portaobjetos (fig. 4) para su evaluación en un microscopio óptico siguiendo el método de Phillips y Hayman (1970), posteriormente se colocaron las raíces clareadas y teñidas en cajas Petri con suficiente lactoglicerol. En un portaobjetos y con agujas de disección, se colocaron 20 segmentos de aproximadamente 1 cm, paralelamente unos a otros. Sobre las raíces se adicionaron gotas de lactoglicerol colocando los cubreobjetos, se eliminaron las burbujas y cada laminilla se selló con esmalte. Para realizar la evaluación se observó al microscopio, se efectuaron tres pasajes equidistantes por laminilla.

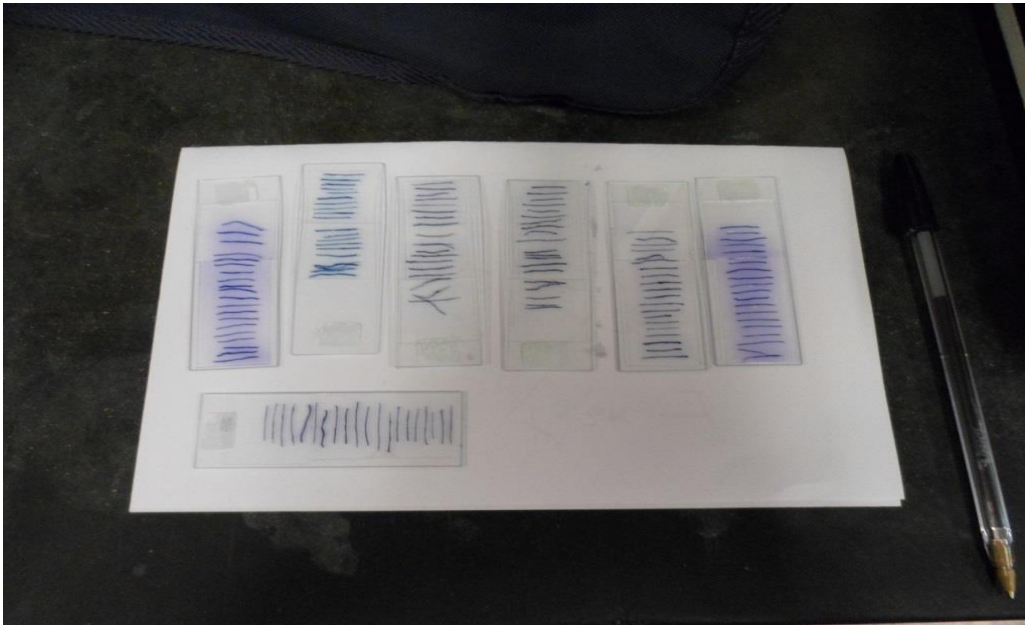


Fig. 4.- Montaje de las raíces teñidas para la cuantificación del porcentaje de colonización micorrízica.

Al revisar un campo óptico donde se encuentra un segmento que contiene hifas, vesículas y/o arbusculos, independientemente del porcentaje de micorrización se le da el valor de uno para la evaluación total y por estructuras.

El porcentaje se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de colonización total} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ de segmentos colonizados})}{\text{N}^\circ \text{ de segmentos totales}} \times 100$$

Para determinar las concentraciones de Pb y Cd en hoja, tallo y raíz, se molieron las muestras con un mortero de porcelana, después se colocaron 0.2 g de muestra en matraces de digestión Micro Kjeldahl de 50 mL. Se agregaron 10 mL de una mezcla de Ácido Nítrico (HNO_3) y Ácido Perclórico (HClO_4) en una proporción 3:1 v/v, para digerirlos (fig. 5) hasta que finalizó la emisión de gases blanquecinos, después se filtraron en papel Whatman Núm. 41 y el filtrado se aforó con agua destilada en un matraz aforado de 50 mL. Las determinaciones de Pb y Cd se hicieron con un espectrofotómetro de absorción atómica (Ortiz y col., 2009).

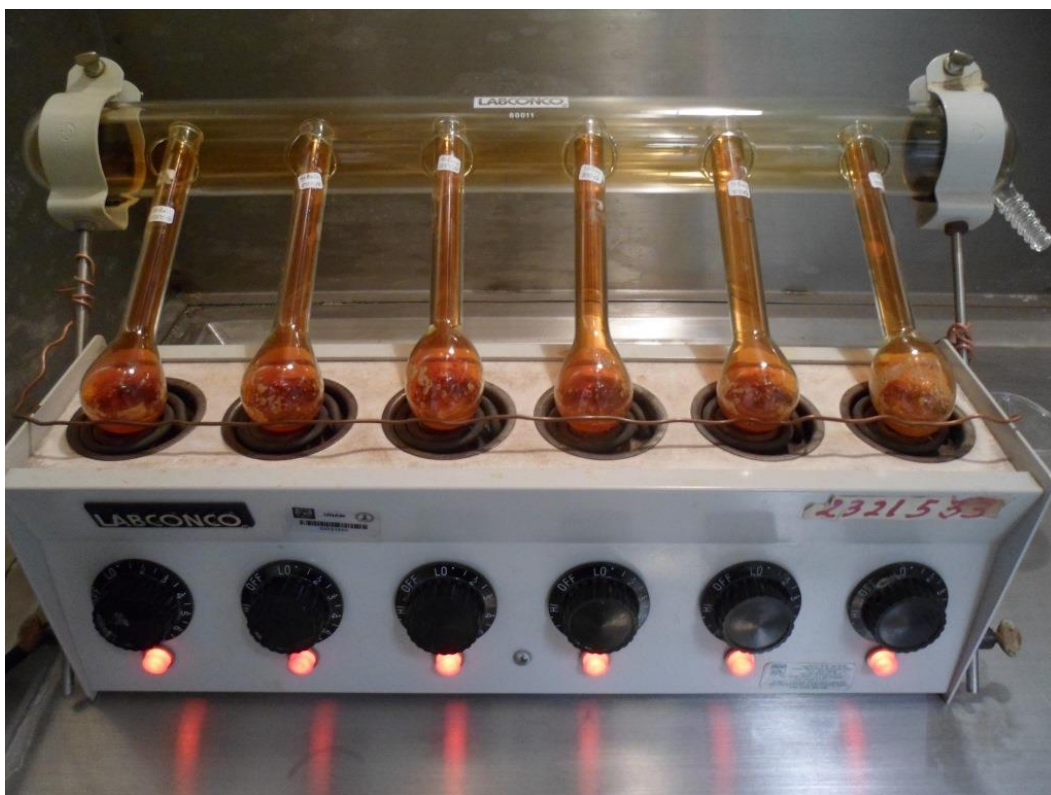


Fig. 5.- Digestiones de las distintas partes de girasol.

Análisis Estadístico

Con los datos obtenidos se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA), y posteriormente una comparación múltiple de medias (Tukey) utilizando el software estadístico STATGRAPHICS CENTURION XVI, con un nivel de confianza del 95%.

Análisis por Espectrometría de Absorción Atómica

Las muestras se almacenaron en envases de polietileno de 50 mL. y se refrigeraron hasta su lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica.

Preparación de las curvas patrón

Se prepararon soluciones de concentraciones ascendentes 0.0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mg·L⁻¹ de los elementos Pb y Cd, se empleó una solución estándar de cada metal, la cual se encuentra a una concentración de 1000 mg·L⁻¹. Con la fórmula $C_1 V_1 = C_2 V_2$ se calculó la cantidad de estándar que requiere cada punto de la curva.

Análisis de las muestras

La lectura de metales pesados se hizo en el laboratorio de espectroscopía de la FES Zaragoza, las muestras de las distintas partes de la planta (raíz, parte aérea y flor), los blancos y los seis puntos de la curva de cada metal. El instrumento utilizado fue el Espectrofotómetro de Absorción Atómica modelo Varian AA-1475; este instrumento emplea lámparas de cátodo hueco específicas para alcanzar la longitud de onda en que se lee cada metal según lo que se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3.- Condiciones de lectura de Pb y Cd según lo especificado por el fabricante.

Elemento	Longitud de onda (μm)	Mezcla de Gases
Pb	217.0	Aire-Acetileno
Cd	228.8	Aire-Acetileno

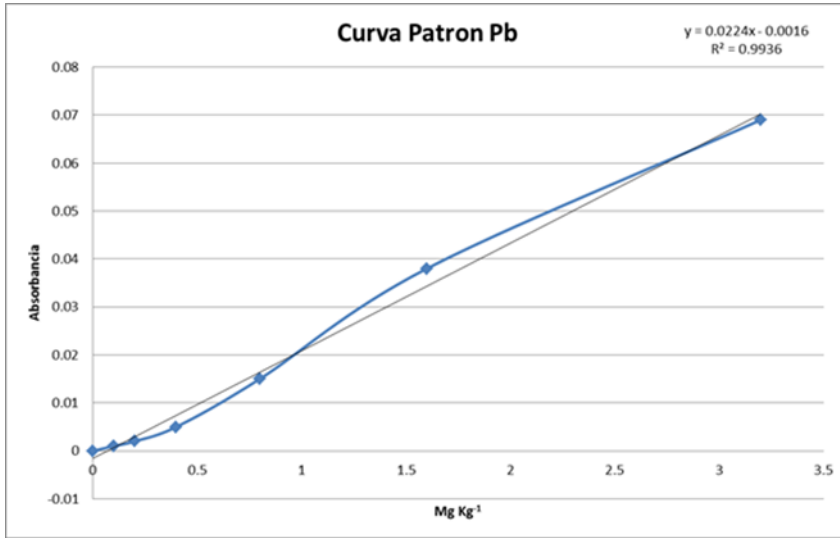


Fig. 6.- Curva patrón de Pb.

Cálculo de la concentración de metales pesados

Se realizó un gráfico de la curva de calibración (fig. 6 y 7) colocando las concentraciones conocidas en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ contra absorbancia. Posteriormente se interpolaron las lecturas de absorbancia de cada muestra y así se determinó la concentración de cada metal en las distintas partes de girasol.

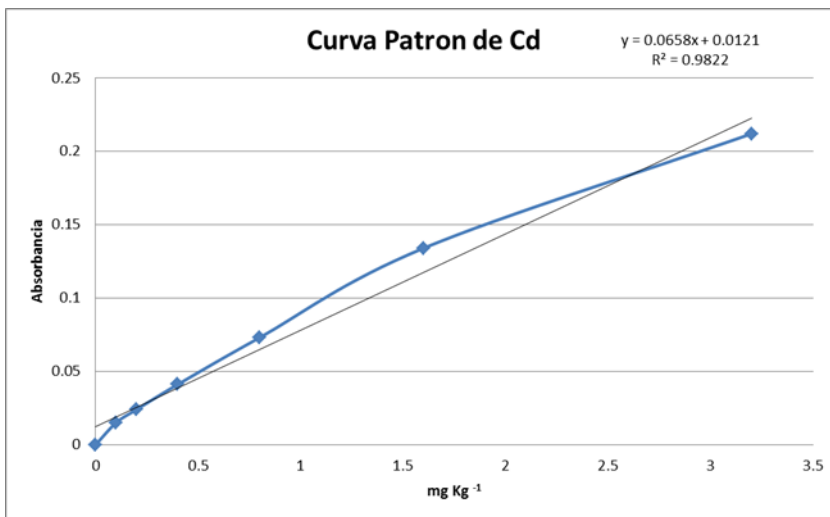


Fig. 7.- Curva patrón de Cd.

Resultados

Las características químicas de la muestra de suelo indican un pH moderadamente ácido (6.34), de acuerdo a la Norma Oficial de Mexicana NOM-021-RECNAT- 2000, también el porcentaje de materia orgánica oscila entre 0.84-2.86 y se clasifica como muy bajo (cuadro 4).

En cuanto a las características físicas tiene un bajo porcentaje de humedad (8.2%), la densidad aparente (0.70 – 0.96 g/cm³) y la densidad real (1.13 – 2.17 g/cm³) nos indica que son suelos arenosos volcánicos, la textura dio valores de entre 70-76% de arena, 16-22% de limo y 8-10% de arcilla dando como resultado un suelo de tipo migajón arenoso.

Cuadro 4.- Propiedades físicas y químicas del sustrato.

Concentración del elemento (mg·kg ⁻¹)	pH	Densidad Aparente g/cm ³	Densidad Real g/cm ³	Arena %	Limo %	M.O %
Testigo	6.34	0.96	2.16	76	16	1.53
0 Pb	6.83	0.86	1.16	70	23	2.02
400 Pb	6.58	0.75	2.17	72	21	2.86
800 Pb	6.88	0.82	1.66	70	20	0.84
1000 Pb	6.74	0.79	1.38	71	19	1.85
0 Cd	6.81	0.85	1.13	72	21	1.34
37 Cd	6.68	0.85	1.85	72	21	2.35
60 Cd	6.56	0.70	2.17	70	23	2.86
120 Cd	7.15	0.90	2.17	70	23	0.84

El porcentaje de germinación de las semillas que se inocularon con *Rizophagus intraradices* sin la adición de elementos (Pb y Cd) es del 68-72 %, esto es distinto a los tratamientos que estuvieron expuestos a las diversas concentraciones de Pb donde presentó un porcentaje de germinación del 56-64% y a los tratamientos de Cd donde conforme se incrementó la adición del elemento, el porcentaje de germinación disminuyó del 60 al 48% (cuadro 5).

Cuadro 5.- Porcentaje de germinación de las semillas de girasol a diferentes concentraciones de Pb y Cd.

Concentración del elemento (mg·kg ⁻¹)	% de germinación de las semillas de girasol con <i>Rizophagus intraradices</i>
0 Pb	68
400 Pb	64
800 Pb	56
1000 Pb	64
0 Cd	72
37 Cd	60
60 Cd	52
120 Cd	48

Al ir incrementándose las concentraciones de Pb, tiene un incremento mínimo el porcentaje de colonización micorrízica, esto puede deberse al efecto inhibitorio que el metal (Pb) ejerció en la colonización micorrízica de las raíces (cuadro 6).

Caso contrario con el Cd el cual sólo disminuyó el porcentaje de colonización micorrízica en la concentración más alta 120 mg·kg⁻¹ Cd.

Cuadro 6.- Porcentaje de colonización total de las raíces de girasol (*Helianthus annuus* L.) a diferentes concentraciones de Pb y Cd.

Concentración de elemento (mg·kg⁻¹)	% de colonización micorrízica total
0 Pb	60
400 Pb	42
800 Pb	44
1000 Pb	47
0 Cd	60
37 Cd	72
60 Cd	76
120 Cd	50

Concentraciones de Pb y Cd en raíz de girasol micorrizado

En el cuadro 7 se puede observar que la raíz del girasol micorrizado presentó una tendencia a adsorber mayor nivel de Pb en la raíz, esto fue incrementándose conforme se elevó la concentración de contaminante (0, 400, 800 y 1000 mg·kg⁻¹Pb), esto significa que la planta tiene capacidad fitoextractora de Pb, también la adición de micorrizas arbusculares (*Rizophagus intraradices*) mejora la absorción del contaminante en el proceso de fitoextracción, esto permitió que las plantas de girasol acumularan el Pb dentro de la raíz.

Caso contrario al Cd donde con o sin la adición de micorrizas arbusculares la planta no absorbe este metal, esto sugiere que el girasol y *Rizophagus intraradices* presentan cierta tolerancia al Cd, además de desarrollar más densidad radical en contraste con los girasoles no micorrizados como se observa en la figura 14.

Cuadro 7.- Valores de concentración en raíz de plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.) micorrizado (M) y no micorrizado (N) en suelo contaminado a diferentes concentraciones de Pb y Cd.

Concentración (mg·kg ⁻¹)	Replica 1 M	Replica 2 M	Replica 3 M	Replica 1 N	Replica 2 N	Replica 3 N
0 Pb	ND	ND	ND	ND	ND	ND
400 Pb	0.4000	0.4000	0.3200	0.3000	0.1000	0.1000
800 Pb	0.4800	0.7200	0.7200	0.2000	0.3200	0.3200
1000 Pb	0.4800	0.6400	1.0909	0.1000	0.1000	ND
0 Cd	ND	ND	ND	ND	ND	ND
37 Cd	ND	ND	ND	0.0066	0.0133	0.0066
60 Cd	0.0066	0.0066	0.0200	0.0066	0.0066	0.0133
120 Cd	0.0466	0.0466	0.0200	0.0133	0.0133	ND

En la figura 8 y el cuadro 8 se observa que la parte que presentó la mayor cantidad de Pb acumulado fueron la raíces de girasol micorrizadas (1) que presentaron diferencias significativas ($\alpha < 0.005$) en contraste con los tratamientos no micorrizados.

Con respecto a los tratamientos de Cd no se presentaron diferencias estadísticas significativas ($\alpha > 0.005$), aunque existen evidencias biológicas a nivel de raíz donde las raíces son más grandes en comparación con los tratamientos no micorrizados.

Cuadro 8.- Prueba de rangos múltiples de la concentración de Pb (1 y 2) y Cd (3 y 4) en raíces de girasol.

Multiple Range Tests for Raiz by Metal

Method: 95.0 percent Tukey HSD

<i>Metal</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
2	12	0.0326863	0.0499071	X
4	12	0.159524	0.0499071	XX
3	12	0.16509	0.0499071	XX
1	12	0.325261	0.0499071	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
1 - 2	*	0.292575	0.142725
3 - 4		0.00556667	0.142725

* denotes a statistically significant difference.

Means and 95.0 Percent Tukey HSD Intervals

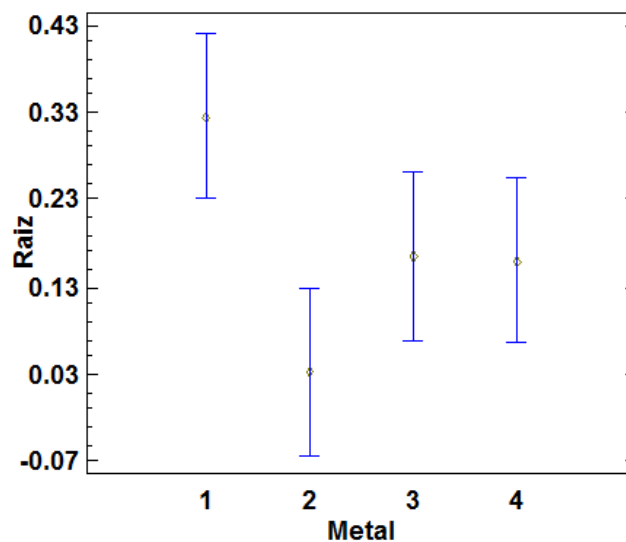


Figura 8.- Comparación de los tratamientos de Pb (1 y 2) y Cd (3 y 4) en raíces de girasol.

Concentraciones de Pb y Cd en parte aérea de girasol micorrizado y no micorrizado

La parte aérea de girasol no tiene capacidad de acumular Cd al adicionar micorrizas arbusculares, como la capacidad natural de la planta para absorber este metal; los tratamientos expuestos al Pb presentan una mejor capacidad de absorberlo con y sin la adición de micorrizas arbusculares, en este metal en particular las plantas micorrizadas presentan una capacidad fitoextractora más elevada ocasionada tal vez por la capacidad de *Rizopagus intraradices* de translocar los metales pesados en la parte aérea de la planta.

Cuadro 9.- Valores de concentración en parte aérea de plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.) micorrizado (M) y no micorrizado (N) en suelo contaminado a diferentes concentraciones de Pb y Cd.

Concentración (mg·kg ⁻¹)	Replica 1 M	Replica 2 M	Replica 3 M	Replica 1 N	Replica 2 N	Replica 3 N
0 Pb	ND	ND	ND	ND	ND	ND
400 Pb	0.2000	0.3000	0.2000	0.2000	0.2000	0.1000
800 Pb	0.2000	0.2000	0.2000	0.1000	ND	ND
1000 Pb	0.3000	0.3200	0.2000	0.1000	0.1000	ND
0 Cd	ND	ND	ND	ND	ND	ND
37 Cd	ND	ND	0.0066	ND	ND	0.0066
60 Cd	ND	ND	ND	0.0066	0.0066	0.0133
120 Cd	ND	ND	ND	0.0066	0.0066	ND

En la figura 9 y el cuadro 10 se observa que el girasol sin la adición de micorrizas tiene la menor concentración de Pb, por lo tanto se puede inferir que la parte aérea de girasol micorrizado lo absorbe mejor por lo que presenta diferencias estadísticas significativas ($\alpha < 0.005$), caso contrario al Cd donde no existieron diferencias estadísticas significativas ($\alpha > 0.005$) esto debido que la planta no tiene capacidad de absorber este metal.

Cuadro 10.- Prueba de rangos múltiples de la concentración de Pb (1 y 2) y Cd (3 y 4) en parte aérea de girasol.

Multiple Range Tests for Parte aérea by Metal

Method: 95.0 percent Tukey HSD

<i>Metal</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
3	12	0.0332726	0.022383	X
4	12	0.0376893	0.022383	X
2	12	0.0431476	0.022383	X
1	12	0.161148	0.022383	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
1 - 2	*	0.118	0.0640112
3 - 4		-0.00441667	0.0640112

* denotes a statistically significant difference.

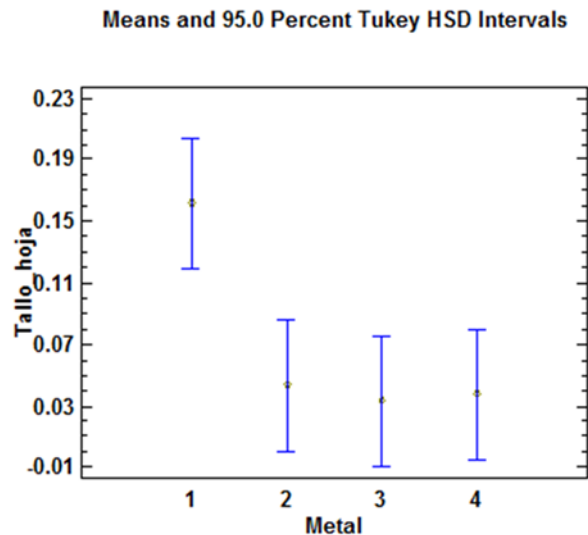


Figura 9.- Comparación de los tratamientos de Pb (1 y 2) y Cd (3 y 4) en parte aérea de girasol.

Concentraciones de Pb y Cd en flor de girasol micorrizado y no micorrizado

En el cuadro 11 se muestra que la flor de girasol micorrizado presentó una tendencia inusual a acumular el Pb más que las plantas que no estuvieron asociadas a las micorrizas arbusculares, esto es importante ya que los mecanismos que las plantas tienen para acumular dichos metales son totalmente distintos, esto sugiere que la adición de *Rizopagus intraradices* promueve la translocación de Pb no sólo a la parte aérea de la planta, sino que incluso a la flor.

En cambio el Cd lo acumula de manera reducida mejor que en los tratamientos no micorrizados donde prácticamente no se detectó.

Cuadro 11.- Valores de concentración en flor de girasol (*Helianthus annuus* L.) micorrizado (M) y no micorrizado (N) en suelo contaminado a diferentes concentraciones de Pb y Cd.

Concentración (mg·kg ⁻¹)	Replica 1 M	Replica 2 M	Replica 3 M	Replica 1 N	Replica 2 N	Replica 3 N
0 Pb	ND	ND	ND	ND	ND	ND
400 Pb	0.1000	0.2000	ND	0.1000	0.1000	0.1000
800 Pb	0.3000	0.2000	0.2000	0.2000	ND	ND
1000 Pb	0.1000	0.1000	0.1000	ND	ND	ND
0 Cd	ND	ND	ND	ND	ND	ND
37 Cd	0.0133	0.0133	0.0133	ND	ND	ND
60 Cd	0.0133	0.0266	0.0200	ND	ND	0.0133
120 Cd	0.0200	0.0200	0.0133	0.0066	0.0133	ND

Se puede observar en la figura 10 y en el cuadro 12, a través del análisis estadístico que las flores de girasol micorrizadas presentaron diferencias estadísticas significativas ($\alpha < 0.005$) por acumular la mayor concentración de Pb, en comparación con los tratamientos no micorrizados, en cambio los tratamientos de Cd no presentaron diferencias significativas ($\alpha > 0.005$) esto se puede explicar debido a que la planta con o sin la adición de *Rizopagus intraradices* no tiene capacidad de absorber este metal.

Cuadro 12.- Prueba de rangos múltiples de la concentración de Pb (1 y 2) y Cd (3 y 4) en flor de girasol.

Multiple Range Tests for Flor by Metal

Method: 95.0 percent Tukey HSD

<i>Metal</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
4	12	-0.000560119	0.0205299	X
3	12	0.00943155	0.0205299	X
2	12	0.0461024	0.0205299	X
1	12	0.162769	0.0205299	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
1 - 2	*	0.116667	0.0587117
3 - 4		0.00999167	0.0587117

* denotes a statistically significant difference.

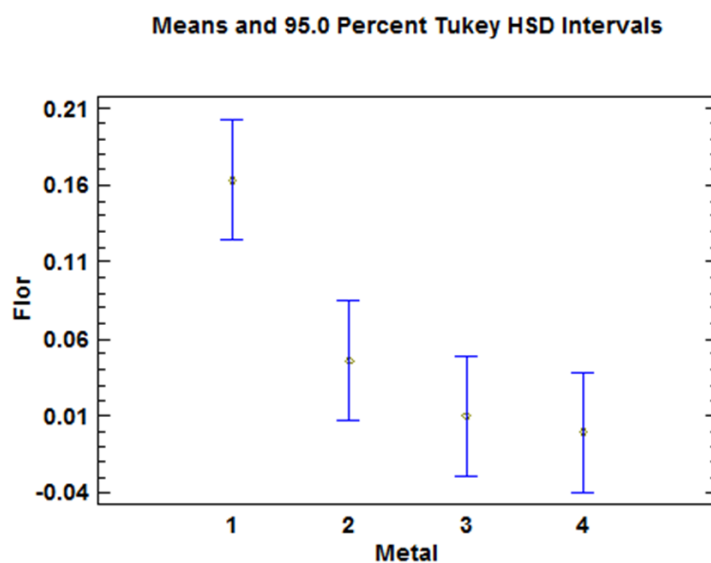


Figura 10.- Comparación de los tratamientos de Pb (1 y 2) y Cd (3 y 4) en Flor de girasol.

Las plantas expuestas al tratamiento de $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Pb presentaron síntomas de clorosis, coloración blanca en los pétalos de las flores y algunas de ellas pétalos apercaminados como se puede observar en las fotos de la figura (11).



Fig. 11.- Efecto del Pb en las flores de girasol.

Las plantas de girasol expuestas a los tratamientos de Cd presentaron alteraciones morfológicas a nivel de flor (fig. 12), ocasionado que hubieran girasoles de 2, 3 y 4 cabezuelas principalmente en el tratamiento de $120 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Cd, lo cual puede ser un efecto indicador de la planta al Cd como lo reportó Pernía y col., (2008).



Fig. 12.- Efecto del Cd en las flores de girasol

Las plantas de girasol sin la adición de *Rizopagus intraradices* presentaron mínimo crecimiento radical, esto posiblemente debido a la toxicidad del Pb presente en el suelo, sin embargo la adición de micorrizas arbusculares reduce la toxicidad a la exposición del Pb en la planta como se puede observar en la figura 13.



Fig. 13.- Longitud de la raíz de girasol con y sin micorrizas a diferentes concentraciones de Pb.

Los girasoles que crecieron a diferentes concentraciones de Cd presentan mayor densidad radical en comparación con los tratamientos de Pb (fig. 14), también es notorio que el tratamiento micorrizado presenta mayor crecimiento radical que el tratamiento no micorrizado, podemos inferir que *Rizopagus intraradices* tiene mejor tolerancia al Cd que al Pb.



Fig. 14.- Longitud de la raíz de girasol con y sin micorrizas a diferentes concentraciones de Cd.

Discusión

De acuerdo a Kidd y col., (2007) la acidez del suelo es un parámetro que determina la movilidad y biodisponibilidad de los metales pesados en el suelo, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000 la acidez del suelo fue moderada y el porcentaje de materia orgánica muy baja, estos factores en conjunto tuvieron efectos en la baja absorción de metales pesados en el presente trabajo.

Volke y col., (2005) también mencionan que los metales pesados son móviles a un pH bajo, del mismo modo la actividad y crecimiento de los hongos son afectados por el pH ya que la mayoría de estos organismos tienen un rango óptimo cuando el pH oscila entre 6.5 a 8.5, en el presente trabajo se obtuvo un pH de 6.34 a 7.15, lo que demuestra que *Rizophagus intraradices* se desarrolló en un medio favorable que permitió un porcentaje moderado de colonización micorrízica para Pb y un porcentaje medio-alto para Cd.

La semilla de girasol tuvo un porcentaje de germinación del 56-64% para los tratamientos expuestos al Pb y del 48-60% para los tratamientos expuestos al Cd, los resultados demuestran que la semilla de girasol puede germinar a más altas concentraciones de Pb y Cd que las establecidas por la Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, además se observó un efecto inhibitorio a los $120 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Cd, Gutiérrez y col. (2011) atribuyen esto a una serie de factores que están presentes en el medio donde se desarrollan las semillas.

Las concentraciones de $800 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Pb, 60 y 120 de Cd afectaron la germinación disminuyendo un 20% con respecto a los tratamientos sin Pb y Cd, esto puede significar que en elevadas concentraciones de estos elementos la movilización de reservas de la semilla se vio afectada y por lo tanto no creció el embrión (de la Rosa y col., 2008).

Con base en estos resultados se puede concluir que existieron diferencias en los porcentajes de germinación en la semilla de girasol silvestre, además se obtuvo germinación en todas las concentraciones de Pb y Cd, que fueron más altas que las reportadas por Gutiérrez y col. (2011), con estos resultados existe evidencia de que la semilla de girasol silvestre puede ser sembrada en suelos contaminados por metales pesados.

El Cd a elevadas concentraciones inhibe el crecimiento del girasol, esto es reportado por Hasan y col. (2009) quienes explican que también a bajas concentraciones se altera el metabolismo de la planta, esto se puede constatar con las alteraciones morfológicas en flor en los girasoles que estuvieron expuestos a este elemento, la adición de micorrizas arbusculares contribuye al crecimiento radical del girasol expuesto a diferentes concentraciones de Cd, esto es muy distinto a los tratamientos no micorrizados donde la toxicidad del Cd es más notable, observando un desarrollo radical bajo y síntomas de clorosis como lo reporta Pernía y col. (2008).

La raíz de girasol inoculado con *Rizophagus intraradices* incrementó la adsorción de Pb en comparación con los tratamientos no micorrizados esto ya ha sido reportado por Karimi y col. (2011) donde explican que la asociación de las micorrizas arbusculares depende de la planta y el metal a tratar, además a mayor densidad y longitud de raíz las hifas permiten que las raíces exploren un volumen de suelo más amplio aumentando el acceso a los metales que no están disponibles para las plantas no micorrizadas.

Esta diferencia en el crecimiento y longitud de la raíz es un indicador importante de la resistencia del girasol al Pb, esto es similar a lo reportado por Azhar y col. (2006) quienes mencionan el efecto fitotóxico del Pb en raíces de girasol, que se refleja en una reducción de su longitud.

El girasol puede translocar de manera reducida el Cd y lo acumula principalmente en la parte aérea y la flor, presentando un efecto indicador tal como lo reportado por Memon y col. (2001) donde mencionan que las plantas pueden acumular metales pesados translocándolos en la parte aérea de sus tejidos.

Entre las especies populares para la fitoextracción están el girasol y la mostaza de la india, debido a su rápido crecimiento, alta biomasa, alta tolerancia y elevada acumulación de metales así como de otros compuestos orgánicos, en base a esto el departamento del medio ambiente de Canadá ha desarrollado una base de datos (PHYTOREM) de 775 plantas con capacidad de acumular o hiperacumular 1 o varios elementos (Hooda, 2007), reportando al girasol como planta hiperacumuladora para Cd, Cr y Ni (de la Rosa y col., 2008; Turgut y col., 2004) sin embargo en estos estudios se hizo uso de soluciones quelantes las cuales incrementaron la absorción y acumulación del Cd.

En el presente estudio la adición de micorrizas arbusculares mostró leves mejoras a altas concentraciones (60 y $120 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) de Cd respectivamente, con base en las condiciones del suelo, pH moderadamente bajo y mínimo porcentaje de materia orgánica, se puede inferir que esto fue una limitante en la disponibilidad del Cd para este trabajo.

Los resultados espectrofotométricos muestran que la mayor cantidad de Pb acumulado se da a nivel de raíz, posteriormente se concentran a nivel de tallo, hoja y flor, esto ocurre principalmente al incrementar la concentración de contaminante, esto difiere a lo reportado por Adewole y col., (2010), quienes realizaron un experimento de acumulación de Pb en girasol, donde la mayor acumulación de este metal se localiza en la parte aérea de la planta.

El experimento de la raíz micorrizada presentó los valores máximos de concentración obtenidos en las concentraciones de 400 , 800 y $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Pb, alcanzando valores de 0.4000 , 0.4800 , 0.7200 y $1.0909 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ respectivamente, lo cual demuestra la capacidad fitoextractora de la planta de girasol, tomando en cuenta que los valores para corroborar que esta planta es hiperacumuladora son de $>1.000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Pb, esto predomina en los tratamientos donde la planta se le adicionó *Rizophagus intraradices* y se encuentra expuesta a elevadas concentraciones de Pb.

Las plantas de girasol que estuvieron expuestas a diferentes concentraciones de Cd presentaron diferencias de absorción con y sin la adición de *Rizophagus intraradices*, en el caso de la raíz los resultados de los tratamientos micorrizados demuestran que en la concentración de $37 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Cd la planta no absorbe el metal, y conforme se va incrementando la concentración de metal lo va acumulando pero muy reducido, tomando en cuenta que los valores de Cd en las plantas hiperacumuladoras son de $>100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Cd, y que la planta reaccionó a la presencia de metal se puede inferir que el girasol es una planta indicadora para detectar la presencia de Cd en el suelo.

Un caso muy distinto en las muestras de flor donde la adición de *Rizophagus intraradices* tiene el efecto en el girasol de incrementar la absorción y posterior translocación mínima de Cd hacia la flor, dónde es muy diferente al caso no micorrizado que prácticamente el metal no se transloca y se queda en tallo y raíz, esto posiblemente se deba al efecto que las micorrizas arbusculares tienen en el suelo, como lo reportado por Rabie (2005), dónde explica que en suelos muy contaminados las micorrizas arbusculares reducen la concentración de metal para proteger a la planta de la toxicidad del metal.

Conclusiones

El girasol tiene capacidad acumuladora para el Pb, disminuyendo la concentración de este metal en el suelo.

A elevadas concentraciones de Pb ($1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) la planta tiende a comportarse como hiperacumuladora.

El girasol presentó malformaciones en flor en presencia de Cd con y sin la adición de micorrizas arbusculares.

El girasol presentó capacidad de absorber, translocar y acumular Cd, la mayor acumulación fue a nivel de flor.

La semilla de girasol presenta porcentaje de germinación del 64 al 72%.

La semilla de *Helianthus annuus* L. puede tolerar y desarrollarse en suelos contaminados con Pb y Cd.

El porcentaje de colonización micorrízica es del 44 al 47% en los tratamientos de Pb, pero se incrementa ligeramente conforme aumenta la concentración del elemento.

En presencia del Cd el porcentaje de colonización micorrízica es del 72% y disminuye conforme incrementa la concentración del elemento.

BIBLIOGRAFÍA

Adewole M. B., Awotoye O. O., Ohiembor M. O., Salami A. O. 2010. Influence of micorrhizal fungi on phytoremediating potential and yield of sunflower in Cd and Pb polluted soils, *Journal of Agricultural Sciences*, Vol. 55, N° 1, pp. 17-28.

Aguilera G. L. I., Olalde P. V., Rubí A. M., Contreras A. R. 2007-2008. Micorrizas Arbusculares, *Ciencia Ergo Sum*, Vol. 14, N° 3, pp. 300-306.

AL-Ghamdi A. A. M., Jais H. M., Khogali A. 2012. Relations between the status or arbuscular micorrhizal colonization in the roots and heavy metal and flavonoid contents in the leaves of *Juniperus procera*, *Journal of Ecology and the Natural Environment*, Vol. 4, N° 8, pp. 212-218.

Alvarado C. J., Nabanita D. S., Enrique A., Juan M. S. Y., Javier V. 2011. Hongos micorrízicos arbusculares y la fitorremediación de plomo, *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, Vol. 4, N° 27, pp. 357-364.

Angelova V. R., Ivanova R. V., Perifanova N. M. N., Uzunova G. I. 2012. Potential of sunflower (*Helianthus annuus* L.) for phytoremediation of soils contaminated with heavy metals, BALWOIS, Ohrid, República de Macedonia, pp. 1-11.

Arshad M., Ayub K. M., Jadoon S. A., Akbar S. M. 2010. Factor analysis in sunflower (*Helianthus annuus* L.) to investigate desirable hybrids, *Pakistan Journal of Botany*, Vol. 42, N° 6, pp. 4393-4402.

Awotoye O. O., Adewole M. B., Salami A. O., Ohiembor M. O. 2009. Arbuscular mycorrhiza contribution to the growth performance and heavy metal uptake of *Helianthus annuus* LINN in pot culture, *African Journal of Environmental Science and Technology*, Vol. 3 N° 6, pp. 157-163.

Aydinalp C y Marinova S. 2009. The effects of heavy metals on seed germination and plant growth on alfalfa plant (*Medicago sativa*), *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, Vol. 15, N° 4, pp. 347-350.

Azhar N., Yasin A. M., Hussain M., Hussain F. 2006. Phytoextraction of lead (Pb) by EDTA application through sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivation seedling growth studies, *Pakistan Journal of Botany*, Vol. 38, N° 5, pp. 1551-1560.

Balderas P. M. A., Cajute L. J., Lugo de la F. J. A., Vázquez A. A. 2003. Suelos agrícolas contaminados por metales pesados provenientes de depósitos de vehículos de desechos, *TERRA Latinoamericana*, Vol. 21, N° 4, pp. 449-459.

Batista G. R. A y Sánchez R. A. 2009. Fitorremediación de metales pesados y microorganismos. *Revista electrónica de la Agencia del Medio Ambiente*, N° 16, pp. 1-16.

Becerril J. M., Barrutia O., García P. J. I., Hernández A., Olano J.M., Garbisu C. 2007. Especies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación, *Ecosistemas*, Vol. 16, N°2, pp. 50-55.

CFIA. 2005. The Biology of *Helianthus annuus* L., en: <http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/helianthus-annuus-l-eng/1330977236841/1330977318934>, fecha de consulta: 14-04-2013.

Chhotu D. J y Fulekar M. H. 2009. Phytoremediation of heavy metals: Recent techniques, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 8, N°6, pp. 921-928.

Ching C. W., Sheng C. W., Clem K., Abdul G. K., Ming H. W. 2007. The role of mycorrhizae associated with Vetiver grown in Pb/Zn-contaminated soils: greenhouse study, *Restoration Ecology*, Vol. 15, N° 1, pp. 60-67.

Christensen T. H. y Haung P. M. 1999. Solid phase cadmium and the reactions of aqueous cadmium with soil surfaces. En: Cadmium in Soils and Plants, Ed. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.

Cuenca G., Cáceres A., Oirdrobo G., Hasmy Z., Urdaneta C. 2007. Las Micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales, *Interciencia*, Vol. 32, N° 1, pp. 23-29.

Cutright T. J., Atkinson I., Walliwalagedara C., Keulen V. H., Wei R. 2008. Identification of *Helianthus annuus* proteins that are upregulated when exposed to heavy metals, *International Meeting of Soil Fertility Land Management and Agroclimatology*, pp. 1015-1025.

De la Rosa G., Cruz J. G., Cano R. I., Fuentes R. R., Gardea T. J. L. 2008. Efecto de la edad de la planta y presencia de SS-EDDS en la tolerancia y absorción de Cr (III) por *Helianthus annuus*, *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol. 7, N° 3, pp. 243-251.

Delgadillo L. A. E., González R. A. G., Prieto G. F., Villagómez I. J. R., Acevedo S. O. 2011. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación, *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, Vol. 14, pp. 597-612.

Del Val C., Barea J. M., Azcon A. C. 1999. Assessing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils, *Applied Soil Ecology*, N° 11, pp. 261-269.

Díaz F. A. y Garza C. I. 2006. Colonización micorrízica arbuscular y crecimiento de genotipos de pasto buffel (*Cenchrus ciliaris*), *Revista Fitotecnia Mexicana*, Vol. 29, N° 3, pp. 203-206.

Dubchack S., Ogar A., Mietelki J. N., Turnau K. 2010. Influence of silver and titanium nanoparticles on arbuscular mycorrhiza colonization and accumulation of radiocaesium in *Helianthus annuus*, *Spanish Journal and Agricultural Research*, Vol. 8, N° 1, pp. 103-108.

Galán H. E. y Romero B. A. 2008. Contaminación de suelos por metales pesados, *Macla*, N° 10, pp. 48-60.

García T. A. 1984. Experimentos de microbiología de suelos, Ed. CECSA, México. Pag. 13-21.

Gosh M. y Singh S. P. 2005. A review on phytoremediation of heavy metal and utilization of its byproducts, *Applied Ecology and Environmental Research*, Vol. 3. N°1, pp. 1-18.

González C. M. d. C. A. 2005. Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos, *TERRA Latinoamericana*, Vol. 23, N° 1, pp. 29-37.

González M. D. y Zapata P. O. 2008. Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. N° 82, pp. 53-61.

Guerra S. B. E. 2008. Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible, *Tecnología en marcha*, Vol. 21, N° 21, pp. 191-201.

Gutiérrez E. L. R., Melgoza C. A., Alarcón H. M. T., Ortega G. J. A., Prado T. D. E., Cedillo A. M. E. 2011. Germinación del girasol silvestre (*Helianthus annuus* L.) en presencia de diferentes concentraciones de metal, *Rev. Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, Vol. 2, N° 1, pp. 49-56.

Hasan A. S., Fanduddin Q., Ali B., Hayat S., Ahmad A. 2009. Cadmium: Toxicity and tolerance in plants, *Journal of Environmental Biology*, Vol. 30, N° 2, pp. 165-174.

Hooda V. 2007. Phytoremediation of toxic metals from soil and waste water. *Journal of Environmental Biology*. Vol. 28, N° 2, pp.367-376.

Hong C. y Cutright T. 2001. EDTA and HEDTA effects on Cd, Cr, and Ni uptake by *Helianthus annuus*, *Chemosphere*, N° 45, pp. 21-25.

Jin Z., Pu X., Xi L., Wusheng J., Donghua L. 2008. Accumulation of Cadmium in three sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars, *Pakistan Journal of Botany*, Vol. 40, N° 2, pp. 759-765.

Karimi A., Habib K., Mozghan S., Mirhassan R. S. 2011. Arbuscular micorrhizal fungi and heavy metal contaminated soils, *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 5, N° 13, pp. 1571-1576.

Kidd P. S., Becerra C. C., García L. M., Monterroso C. 2007. Aplicación de plantas hiperacumuladoras de níquel en la fitoextracción natural: el género *Alyssum* L. *Ecosistemas*, Vol. 16, N° 2, pp. 26-43.

Larenas P. G. y L de Viana M. 2005. Germinación y supervivencia del pasto cubano *Tithonia tubaeformis* (Asteraceae) en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, *Ecología Austral*, N° 15, pp. 177-181.

Lenoir C. y Tornari G. 2004. Contaminación y Tratamiento de Suelo. Buenos Aires. Argentina. 65pp.

Liao J. P., Lin X. G., Cao Z. H., Shi Y. Q., Wong M. H. 2003. Interactions between arbuscular mycorrhizae and heavy metals under sand culture experiment, *Chemosphere*, Vol. 50, pp. 847-853.

Llugany M., Tolra R., Poschrieder C., Barceló J. 2007. Hiperacumulación de metales : ¿Una ventaja para la planta y el hombre ?, *Ecosistemas*, Vol. 2, N° 16, pp 4-9.

Luevanos E. M. P., Reyes V. M. H., Villareal Q. J. A., Rodriguez H. R. 2010. Obtención de híbridos intergenéricos *Helianthus annuus* x *Hithonia rotundifolia* y su análisis morfológico y molecular. *Acta Botanica Mexicana*, N° 90, pp. 105-118.

Manacorda A. M. y Cuadros D. 2005. Técnicas de Remediación Biológicas. *Microbiología Ambiental* . pp. 1-21.

Marrero C. J., Amores S. I., Coto P. O. 2012. Fitorremediación una tecnología que involucra a las plantas y microorganismos en el saneamiento ambiental, *ICIDCA Sobre los derivados de la caña de azúcar*, Vol. 46, N° 3, pp 52-61.

Memon A. R., Aktoprakligil D., Özdemir A., Vertii A. 2001. Metal accumulation and detoxification mechanisms in plants, *Turkish Journal of Botany*, Vol. 25, pp. 111-121.

Mendoza V. R., Reyes V. M. H., Espinoza Z. C., Villareal Q. J. A. 2006. Viabilidad de polen de una línea de girasol cultivado en el girasol silvestre (*Helianthus annuus* L. SSP. *Texanus Heiser*) y en su descendencia híbrida. *Acta Botanica Mexicana*, N° 76, pp. 47-57.

Morquecho A. 2005. Determinación de metales pesados en perfiles de suelos aluviales de la cuenca del río Lerma, Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.

Navarro A. J. P., Aguilar A. I., López M. J. R. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas, *Ecosistemas*, Vol. 16, N° 2, pp. 10-25.

Norma Oficial de Mexicana NOM-021-RECNAT- 2000, Norma Oficial Mexicana. Diario Oficial de la Federación, segunda sección. 31 de Diciembre de 2002. pp. 82.

Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio. Diario Oficial de La Federación. Viernes 2 de marzo de 2007, Segunda Sección.

Ortega O. H., Benavides M. A., Arteaga A. S., Zermelo G. A. 2009. Fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados, *Temas Modernos de Nutrición vegetal. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo*, A. C, pp. 124-148

Ortiz C. H. G., Trejo C. R., Valdez C. R. D., Arreola A. J. G., Flores H. A., B. López A. B. 2009. Fitoextracción de plomo y cadmio en suelos contaminados usando quelite (*Amaranthus hybridus* L.) y micorrizas, *Revista Chapingo Serie Horticultura*, Vol. 15 N°2, pp. 161-168.

Pereira G., Sánchez M., Ríos D., Herrera M. A. 2001. Micorrizas vesículo arbusculares y su incidencia en el crecimiento de plántulas de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, *Bosque*, Vol. 22, N° 2, pp. 39-44.

Pernía B., de Sousa A., Reyes R., Castrillo M. 2008. Biomarcadores de contaminación por Cadmio en las plantas, *Interciencia*, Vol. 33, N°2, pp. 112-119.

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

Porębska G. y Ostrowska A. 1999. Heavy metal accumulation in wild plants: Implications for phytoremediation, *Polish Journal of Environmental Studies*, Vol. 8, N°6, pp. 433-442.

Prahba K. P. y Loretta Y. L. 2007. Phytoremediation Technology: Hyper-accumulation metal in plants, *Water Soil Pollut*, N° 184, pp. 105-126.

Rabie H. G. 2005. Contribution of árbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal-polluted soil. *African Journal*, Vol. 4, N° 4, pp. 332-345.

Rodríguez O. C. J., Rodríguez F. H., De Lira R.G., Martínez de la C. J., Lara M. J. L. 2006. Capacidad de seis especies vegetales para acumular plomo en suelos contaminados, *Revista Fitotecnia Mexicana*, Vol. 29, N° 3, pp. 239-245.

Rodríguez S. M., Martínez de la C. N., Romero P. M. C., del Rio L. A., Sandalio L. M. 2008. Toxicidad de Cadmio en plantas, *Ecosistemas*, Vol. 17, N°3, pp. 139-146.

Rzedowski G. C. y Rzedowski J. 2008. Compositae. Tribu Helianthae (II). En Rzedowski G. C., Rzedowski, Flora del Bajío y de regiones adyacentes, fascículo 157. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío, Consejo Nacional de la Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México.

Sudová R., Jurkiewics A., Turnau K., Vosátka M. 2007. Persistence of heavy metal tolerance of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* under different cultivation regimes, *SYMBIOSIS*, N° 43, pp. 71-81.

Turgut C., Katie M. P., Cutright T. J. 2004. The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr and Ni from soil using *Helianthus annuus*, *Environmental Pollution*, Vol. 131, N° 1, pp. 147-154.

Ullah R., Bakth J., Shafi M., Iqbal M., Khan A., Saeed M. 2011. Phyto-accumulation of heavy metals by sunflower (*Helianthus annuus* L.) grown on contaminated soil, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 10, N° 75, pp. 17192-17198.

Vashegy A., Mezősi G., Barta K., Farsang A., Dormány G., Bartha B., Pataky S., Erdel L. 2005. Phytoremediation of heavy metal pollution: A case study, *Acta Biologica Szegediensis*, Vol. 49, N° 1-2, pp. 77-79.

Volke S. T., y Velasco J. A. 2002. Tecnologías de Remediación de Suelos Contaminados. INE-SEMARNAT. México. pp. 64.

Volke S. T., Velasco T. J. A., de la Rosa P. D. A. 2005. Suelos Contaminados por metales y Metaloides. INE-SEMARNAT. México. pp. 141.

Wong H. M. 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*. Vol. 50, N°3, pp. 775-780.