

Evaluación de la adaptación de *Helianthus annuus* en asocio con hongos micorrízicos en suelos contaminados con plomo*

*Evaluation of adaptation of *Helianthus annuus* in association with mycorrhizal fungi in soils contaminated with lead*

Carolina García Ávila[†], Laura Andrea Villada Sierra[‡], Julian Robayo Gómez[§]

Recibido: 07/12/2017 Aprobado: 23/02/2018

Resumen: Los elementos potencialmente tóxicos como plomo (Pb), se han convertido en contaminantes del suelo, logrando que su transferencia se realice a través de cadenas tróficas. Para estabilizar esta contaminación en los suelos se han propuesto estrategias como la fitorremediación y la biorremediación, debido a que representan alternativas económicas y de fácil acceso. *Helianthus annuus*, es una planta con potencial fitorremediador y en asocio con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) genera un efecto biorremediador. En el presente estudio, se evaluó la adaptación que tiene el *H. annuus* en asocio con HMA para adaptarse a un medio contaminado con plomo. Se analizaron variables en el software Statgraphics CENTURION XV.11 de longitud de tallo, número de hojas, peso fresco y peso seco para determinar la adaptación de la planta al medio; además, se realizó conteo de esporas, tinción de raíces y porcentaje de colonización micorrizal en las raíces inoculadas. Se detectó que *H. annuus* es

capaz de desarrollarse en medios contaminados con plomo y los HMA tienen una alta capacidad infectiva en los medios utilizados.

Palabras clave: adaptación, contaminación, girasol, hongos micorrízicos, plomo, suelo.

Abstract: Potentially toxic elements such as lead (Pb) have become soil contaminants, and after that transfer is made through food chains. To stabilize this contamination in soils strategies, have been proposed as phytoremediation and bioremediation, because, they represent economic alternatives and easily accessible. *Helianthus annuus*, is a plant with phytoremediation potential and in association with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) generates a biorremediador effect. In this investigation, the adaptation that has *H. annuus* in association with HMA to fit a lead-contaminated medium was evaluated. Variables were analyzed in the software Statgraphics CENTURION XV.11 stem

* Artículo resultado de investigación.

[†] M.Sc. Biotecnología. Docente. Tecnológico de Antioquia Institución Universitaria. Medellín, Colombia. cavilaga@tdea.edu.co.

[‡] Ingeniera Ambiental. Tecnológico de Antioquia Institución Universitaria. Medellín, Colombia. lauravillada8745@gmail.com.

[§] Biotecnólogo. Investigador. Tecnológico de Antioquia Institución Universitaria. Medellín, Colombia. julianrob@hotmail.es.

length, number of leaves, fresh and dry weight to determine the adaptation of the plant to the environment; also, spore count, staining roots and mycorrhizal colonization percentage in inoculated roots was performed. It was found that *H. annuus* is able to develop in contaminated media with lead and HMA have a high infectivity in the media used.

Keywords: adaptation, pollution, sunflower, mycorrhizal fungi, lead, soil.

Introducción

Los metales pesados han sido conocidos por su toxicidad y están sujetos a las regulaciones legales con el objetivo de disminuir su presencia en el ambiente. Si bien, esto ha contribuido a la disminución de los niveles de exposición en los humanos y animales, sigue siendo un problema de salud ambiental (European Environment Agency, 2013). La contaminación en suelos por metales pesados, ocurre cuando estos son irrigados con aguas procedentes de desechos de minas, aguas residuales contaminadas de parques industriales y municipales (Zapata & Ávila, 2014). Estos son clasificados como sustancias cancerígenas según Johnson (1997). El suelo contaminado con metales tóxicos como arsénico (As), cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (Pb) y zinc (Zn), presentan grados altos de toxicidad y representan un desafío a la hora de aplicar tecnologías para la limpieza de suelos (Raskin, Smith, & Salt, 1997).

Los contaminantes pueden llegar a permanecer como residuo en el suelo durante miles de años, aún después de que su incorporación se haya detenido. En el caso del plomo, este puede permanecer en el suelo de 740 a 5.900 años y sus concentraciones están influenciadas por el tipo de suelo y la movilidad relativa relacionada con las propiedades fisicoquímicas del mismo (Rueda, Rodríguez, & Madriñan, 2013). Las intoxicaciones por este agente comúnmente se conocen con el nombre de plumbemia o saturnismo y afectan casi todos los órganos y sistemas en el cuerpo, siendo el más sensible el sistema nervioso central y periférico, induciendo alteraciones neurológicas y conductuales especialmente en los niños (Organización Mundial de la Salud, 2006; World Health Organization, 2003 en Congreso

de la República de Colombia, 2015). Tal es el caso del acetato de plomo, una sal venenosa y altamente soluble (Galindo, & López, 2006); la cual generalmente, es utilizada como colorante de

textiles, para la fabricación de impermeables, barnices, secantes de plomo, pigmentos de cromo, procesos de cianuración del oro, pinturas antifoliantes, reactivos analíticos, insecticidas y como fijador del color en los tintes del cabello.

En Colombia aún es frecuente la presencia del plomo como componente de los siguientes productos: pinturas, pesticidas, fertilizantes, soldaduras, vidrio plomado, barniz para cerámicas, municiones, plomos para pesca, cosméticos (sobre todo productos importados), baterías para carros, tintas para tipografías y componentes de reparación de radiadores (Congreso de la República de Colombia, 2015).

En 2011 se publicaron dos investigaciones que evaluaron la concentración de metales en dos zonas distintas del río Bogotá, en aguas del río Tunjuelo y en el río Chicú; en la zona sur y noroccidental de la ciudad de Bogotá. En particular, llama la atención una notoria y marcada concentración de plomo en suelo y sedimento en el río Chicú, hasta 20 veces mayor en comparación con el río Tunjuelo (Rodríguez, 2011; Romero, 2011 en Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2012). Lo que indica que los niveles de plomo reportados varían de forma marcada de acuerdo con la zona y las características particulares de contaminación.

En el departamento de Antioquia, la exposición a los metales pesados se da primordialmente en el área ocupacional y es más común en hombres. En el año 2012 se presentaron dos casos mortales en el departamento. Las subregiones con mayor carga de intoxicaciones son: el Suroeste, Valle de Aburrá y Oriente, siendo Medellín el municipio que más casos notifica, puesto que supera la tasa de incidencia departamental (Gobernación de Antioquia, 2011 - 2020).

Actualmente, existen métodos físicos y/o químicos para el tratamiento de estos elementos potencialmente tóxicos, los cuales además de

tener costos elevados, no siempre eliminan los contaminantes del suelo, algunos de estos métodos son: reducción química, es realizada in situ y consiste en agregar un compuesto químico reductor, con el objetivo de disminuir la toxicidad del metal; enjuague in situ, consiste en inundar la zona con una solución apropiada según el contaminante, con el objetivo de movilizarlo por solubilización o formación de emulsiones para llevarlas a la superficie y eliminarlas; la solidificación, se enfoca en agregar un reactivo de unión para encapsular los elementos; tratamiento térmico, implica la destrucción de los contaminantes a través de la exposición a altas temperaturas; electrocinética, aplica corriente directa a baja intensidad a través del suelo, esta corriente moviliza especies cargadas, y hace que los iones se muevan hacia los electrodos (US Environmental Protection Agency, 2016). No obstante, se cuenta con estrategias ambientales como la remediación biológica, siendo enfáticos en la fitorremediación y la biorremediación, que en promedio son más económicas que la aplicación de tecnologías basadas en ingeniería (Singh, Vyas, Sahni, & Sangwan, 2015).

En comparación con los métodos físicos y/o químicos, la fitorremediación representa una técnica competitiva, fácil de implementar y con aceptación pública (Singh, Vyas, Sahni, & Sangwan, 2015). En esta técnica las plantas utilizan diferentes procesos para el tratamiento de los contaminantes, los principales son: fitotransformación: también conocida como fitodegradación, consiste en la descomposición de los contaminantes orgánicos en el suelo, lo cuales pueden integrarse con el tejido vegetal. Biorremediación en la rizósfera: también se conoce como fitoestimulación o biorremediación asistida. Esta se produce al proporcionar inicialmente un aumento en la producción de carbono y nitrógeno requeridos para la producción de bacterias y hongos micorrízicos, que en conjunto fomentan la degradación del suelo y eventualmente del contaminante. Fitoestabilización: se refiere al uso de plantas para estabilizar los contaminantes en el suelo, evitando su dispersión en el ambiente. Básicamente, se pretende que la planta almacene el contaminante para que luego esta sea removida del suelo y almacenada de forma segura. Este

método presenta algunas limitaciones, debido al riesgo que representa para la cadena alimentaria. Fitoextracción: se basa en la utilización de plantas para acumular y translocar los contaminantes del suelo a las raíces, hojas y brotes. Se debe considerar, la posibilidad económica de recuperar los metales de los tejidos de la planta. Rizofiltración: las raíces de las plantas se utilizan para absorber, concentrar y precipitar contaminantes metálicos de la superficie. La rizofiltración, es un proceso que se realiza in situ, lo cual evita perturbaciones al ambiente (Singh, Vyas, Sahni, & Sangwan, 2015).

El éxito de los tratamientos de fitorremediación dependen de identificar las especies vegetales que toleren estrés, acumulen los metales pesados y produzcan cantidades grandes de biomasa (Chico, Cerna, Rodríguez, & Guerrero, 2012). Sin embargo, existen factores fisicoquímicos que son importantes para garantizar el éxito de la fitorremediación, como: la solubilidad del metal en la solución del suelo, el tipo de suelo (textura), la humedad, el pH, el potencial redox, la capacidad de intercambio catiónico y los procesos bioquímicos (Sheoran, Sheoran, & Poonia, 2015).

La evaluación de los niveles de tolerancia a metales pesados en algunas plantas, ha permitido establecer especies vegetales para la reforestación en los sitios con presencia de elementos potencialmente tóxicos. Esta tolerancia en las plantas se ve representada por su capacidad de adaptación a estos suelos y su capacidad para reproducirse (Adams, Raman, & Hodkings, 2012). Se reporta que algunas especies pertenecientes a la familia Asteraceae, toleran altos niveles de metales pesados, en comparación con otros grupos taxonómicos, y se les ha propuesto como especies fitorremediadoras (Chico, Cerna, Rodríguez, & Guerrero, 2012). *H. annuus* perteneciente a esta familia, es una planta ampliamente reconocida como fitorremediadora (Gutiérrez, y otros, 2011), utilizando procesos de fitoextracción en suelo y sedimentos (Singh, Vyas, Sahni, & Sangwan, 2015). Procede del oeste de América del Norte, se adapta fácilmente a diferentes ambientes, por lo que, actualmente se cultiva en los cinco continentes. La producción de biomasa depende de la cantidad de energía lumínica que interceptan

sus hojas, determinada por su índice de área foliar y de la eficiencia de su uso (Díaz, Duarte, & Plante, 2003). Por su alta capacidad radicular puede extraer del 10 al 25 % de los metales del suelo, ya que estas plantas no son fácilmente afectadas por los contaminantes. Esta especie absorbe metales pesados en grandes cantidades, por lo que, se considera una planta hiperacumuladora para cadmio (Cd), zinc (Zn), plomo (Pb), cromo trivalente (Cr (III)) y hexavalente (Cr (VI)) (Gutiérrez, y otros, 2011).

El efecto acumulador en las plantas puede ser potenciado con la aplicación de microorganismos, como los hongos formadores de micorrizas (HFM), estrechamente relacionados con las raíces de las plantas (Pérez, Rojas, & Montes, 2011). La aplicación de estos microorganismos a suelos contaminados, genera un efecto biorremediador. En otras palabras, la biorremediación es el uso de microorganismos para la transformación química o física de los contaminantes, esto implica una transformación del compuesto químico complejo o simple en formas no peligrosas (Wainwright, 1999).

En procesos de biorremediación predomina el efecto de las micorrizas arbusculares (MA), las cuales son asociaciones simbióticas mutualistas que se establecen entre los hongos del orden Glomales y las raíces de una planta. Durante la simbiosis los hongos reciben hasta el 20% del carbono capturado en la fotosíntesis. Así las MA contribuyen a la captura de carbono del suelo, a su vez, ayudan a mejorar la nutrición de las plantas (Gutjahr, 2014). Entre estas asociaciones, destacan por su ubicuidad las endomicorrizas o micorrizas arbusculares, aparentemente las más comunes en la naturaleza, ya que, ocurren en la mayoría de los suelos y en el 80% de las familias de plantas terrestres. La importancia de las MA ha aumentado en la última década, debido a reportes de efectos benéficos sobre las plantas, que van desde incrementos en la absorción de nutrientes en el suelo, mejoramiento del desarrollo y nutrición de la misma y protección contra agentes patógenos (Aguilera, Olalde, Arriaga, & Contreras, 2007). Por consiguiente, el efecto en la tolerancia y la acumulación de metales que tienen los hongos

formadores de micorrizas depende de las propiedades físicas y químicas de los suelos y el tipo de planta hospedera (Castañón, Vanegas, Lobos, & Gaete, 2013).

En consecuencia, el éxito de los tratamientos biológicos presenta un reto porque: 1. Los residuos orgánicos se dispersan en el suelo de manera heterogénea. Esto en contraste con los fluidos que se dispersan homogéneamente. Además, los contaminantes pueden estar presentes como sólidos, líquidos o gases, libres en la solución del suelo o enlazados químicamente a las partículas; 2. La concentración de los contaminantes puede ser extremadamente baja o alta. Concentraciones bajas pueden no ser apropiadas para soportar el crecimiento microbiano. Por otra parte, las concentraciones altas pueden ser tóxicas e inhibir el crecimiento; 3. La resistencia del contaminante, debido a que muchos contaminantes son resistentes a la biodegradación o pueden requerir esfuerzos metabólicos combinados con o sin la presencia de carbono y energía adicional; 4. Las condiciones ambientales para el crecimiento microbiano, debido a que la creación y el mantenimiento de las condiciones óptimas es un desafío, en especial para aplicaciones in situ (Wainwright, 1999).

Por consiguiente, la finalidad de esta investigación fue evaluar la capacidad de adaptación del *H. annuus* en asociación con hongos micorrízicos en suelos contaminados con plomo.

Metodología

Localización geográfica.

Se realizó un experimento de invernadero en las Instalaciones del Tecnológico de Antioquia en la sede de Robledo, ubicada en la ciudad de Medellín (coordenadas 6° 16' 46" N, 75° 35' 01" O). Con una altitud de 1495 m.s.n.m., una temperatura promedio de 24°C y una humedad promedio que oscila entre 63% - 73% (IDEAM).

Diseño experimental.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con un arreglo factorial 4 x 2 como lo muestra la Tabla 1, con tres repeticiones; las cuales consistieron en la combinación de: tres niveles de concentración

de plomo en la solución del suelo, un nivel control negativo sin presencia del contaminante y dos niveles de hongos micorrízicos arbusculares (inoculado y no inoculado). Los tres niveles de concentración se determinaron partiendo de las concentraciones propuestas por la agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados

Unidos (EPA), que determina un límite máximo entre 300-500 mg de Plomo/Kg de suelo (Chico, Cerna, Rodríguez, & Guerrero, 2012). Los hongos se tomaron a partir de un inóculo crudo SOBIOTECH S.A.S®, constituido por esporas, fragmentos de hifas y raíces colonizadas.

Tabla 1. Diseño experimental

Niveles de micorrizas	Tratamientos	Descripción
Inoculado	T1	Inoculado con micorriza, concentración de Pb 0 mg/Kg
	T2	Inoculado con micorriza, concentración de Pb 300 mg/Kg
	T3	Inoculado con micorriza, concentración de Pb 500 mg/Kg
	T4	Inoculado con micorriza, concentración de Pb 700 mg/Kg
Sin inoculación	T5	Sin inoculación de micorriza, concentración de Pb 0 mg/Kg
	T6	Sin inoculación de micorriza, concentración de Pb 300 mg/Kg
	T7	Sin inoculación de micorriza, concentración de Pb 500 mg/Kg
	T8	Sin inoculación de micorriza, concentración de Pb 300 mg/Kg

Fuente: Elaboración propia, 2016.

Método para obtener las concentraciones de plomo

El compuesto plomado que se utilizó en esta investigación para extraer las concentraciones de plomo puro, fue el acetato de plomo (Pb (CH₃COO)₂·3H₂O de laboratorios Protokimicas®.

Las concentraciones que se trabajaron, se basaron en los límites máximos permisibles reportados por la EPA y en estudios anteriores los cuales son: González (2009), concentraciones de: 500 mg/Kg, 600 mg/Kg, 700 mg/kg y 0 mg/kg; Chico, Cerna, Rodríguez, & Guerrero (2012), concentraciones de 100µM/L, 200 µM/L, 300 µM/L, 400 µM/L, 500 µM/L, 600 µM/L y en Gutiérrez, y otros, (2011) se evaluaron concentraciones de: 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L y 400 mg/L. Por tanto, se determinaron los siguientes niveles:

- 300 mg de Pb/Kg de suelo
- 500 mg de Pb/ Kg de suelo
- 700 mg de Pb/Kg de suelo

Unidades experimentales

Las unidades experimentales correspondieron a macetas. Estas, se obtuvieron a partir de cajas de cartón recicladas con las siguientes dimensiones: largo 49 cm, alto 25 cm y ancho 16,5cm. Estas cajas se forraron con bolsas plásticas de color negro para evitar derrames. Además, el suelo donde se ubicaron estuvo cubierto con un plástico para evitar posibles filtraciones.

Suelo.

Se utilizó un Andisol libre de contaminantes, proveniente del municipio de Rionegro; dicho tipo de suelo, generalmente, tiene un pH ácido y presenta alta fijación de fosfatos. Antiguamente, hacía parte de una granja con cultivo de pastos. Este suelo se sometió a un proceso de esterilización en el laboratorio de toxicología del Tecnológico de Antioquia, en autoclave a 121°C, y 15 lb de presión por 30 minutos, para eliminar microorganismos y esporas que pudieran alterar el resultado de los tratamientos. Se mantuvo entre un 50-60 % de la capacidad máxima de retención de agua,

para lo cual, se aplicó agua estéril. Cada maceta tuvo un contenido de 5 Kg de suelo, el cual, se contaminó con la solución de acetato de plomo disuelto en 500 mL de agua destilada. Las unidades experimentales estuvieron expuestas a condiciones ambientales de la ciudad de Medellín, sin embargo, se protegieron de la lluvia para tener control respecto a la humedad.

Inoculación del hongo micorrízico.

La inoculación en el sustrato se realizó bajo condiciones de asepsia, mezclando en forma radial y superficial un inóculo crudo mixto. Se inoculó cada semilla con 100 gramos de hongos formadores de micorizas.

Germinación de semillas.

Las semillas seleccionadas fueron de tipo comercial Domino Helianthus annuus for cutting, FERCON®. El proceso de germinación se realizó en el laboratorio de biología del Tecnológico de Antioquia en su campus Robledo; primero se sometieron a un proceso de desinfección superficial por inmersión, para lo cual se sumergieron en hipoclorito de sodio al 10% por un minuto y posteriormente en etanol al 70% por un minuto; finalizando con tres lavados en agua destilada (Zhu, y otros, 2000 en Gutiérrez, y otros, 2011). Luego se llevaron a cajas Petri estériles para germinarlas. Cada caja Petri se dotó con papel absorbente estéril, sobre las cuales se depositaron las semillas. Antes de colocar las semillas, éstas se humedecieron por inmersión, en agua destilada. Se consideró una semilla germinada, cuando su radícula tuvo al menos 2 mm de longitud (Carrillo, y otros, 2002).

Variables.

Se realizaron mediciones tres veces a la semana, durante 30 días del desarrollo de la planta en términos de longitud del tallo (cm), alteraciones morfológicas (clorosis, quemaduras y deformación de hojas, entre otras), para analizar la adaptabilidad de la planta al medio contaminado. Al momento de la cosecha, se tomó su peso en fresco (g) y luego de un secado, su peso seco (g).

Las plantas de *H. annuus.*, fueron cosechadas cuatro semanas después de la siembra, en este período se obtuvo una biomasa radicular suficiente para realizar los ensayos. Se tomaron muestras de raíz en cada maceta, para determinar el porcentaje de infección de los HMA. El método utilizado para la tinción de raíces se basó en la técnica implementada por Vierheilig, Coughlan, Wyss, & Piché (1998), donde se establece la utilización de tinta china al 5% en una solución de vinagre (ácido acético). Sin embargo, fue modificada y se trabajó con una solución al 1% de tinta china en una solución de vinagre blanco. Las raíces fueron lavadas y llevadas al baño maría cubiertas con una solución de hidróxido de potasio (KOH) durante 20 minutos, posteriormente, fueron sumergidas en la solución de tinta china marca Parker® y vinagre (ácido acético) durante 8 minutos. Por último, fueron retiradas de la solución colorante y llevadas al microscopio para su observación. La determinación del porcentaje de colonización micorrizal, se realizó según la técnica de Giovannetti y Mosse (1980) en Sieverding (1983). La extracción de esporas, se realizó por el método de tamizado, centrifugación en gradiente de sacarosa y observación estereoscópica (Genderman y Nicolson (1963) en Sieverding, (1983).

Manejo cultivo.

El manejo del cultivo se realizó bajo condiciones de estrés, debido a que en condiciones naturales las plantas estarían sometidas a una disponibilidad mínima de nutrientes. Por lo tanto, no se aplicó ningún tipo de fertilizantes o solución nutritiva.

Manejo preventivo de plagas.

Para el manejo preventivo de plagas, se instalaron cuatro trampas cromáticas para insectos, dispuestas a lo largo de los tratamientos, con el fin de capturar insectos parasitarios. Además, se aplicó durante dos semanas el producto Alisin®, un insecticida orgánico a base de ají y ajo, con el fin de repeler plagas.

Bioseguridad.

En la ejecución del proyecto, todos los investigadores utilizaron barreras de bioseguridad para disminuir la exposición directa al material manipulado, mediante la utilización de materiales adecuados que se interpusieran al contacto de los mismos, tales como: guantes de nitrilo, tapabocas, gafas, gorro de laboratorio y bata de bioseguridad. Adicionalmente, al inicio y finalización de los procedimientos experimentales se realizó el lavado higiénico de manos. Para el desarrollo del proyecto no se utilizaron organismos genéticamente modificados. Los procedimientos se desarrollaron bajo condiciones asépticas y con control de variables. La eliminación de material con microorganismos o reactivos, se realizó con un conjunto de dispositivos y procedimientos adecuados a través de los cuales los materiales fueron depositados y eliminados sin riesgo.

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de varianza (Prueba F), para determinar si existían diferencias significativas en función de los tratamientos y la prueba de rango múltiple de Duncan, para determinar la separación de medias. Para los análisis estadísticos se empleó un nivel de significancia ($P \leq 0.05$) y se utilizó el software estadístico Statgraphics CENTURION XV.II.

Resultados

Análisis estadístico de las variables.

La producción de hojas durante el desarrollo de la planta, no pudo ser analizada por el programa estadístico elegido, debido a la poca variabilidad que presentan los datos, lo que traduce que las plantas en promedio produjeron la misma cantidad de hojas.

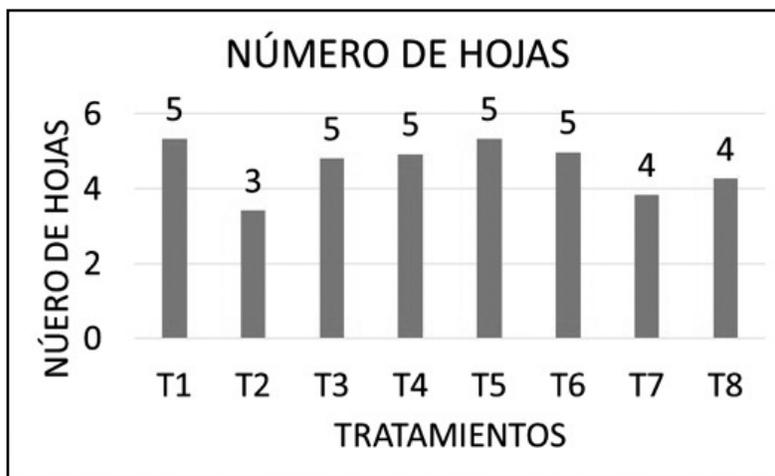


Figura 1. Número de hojas desarrolladas por las plantas de *Helianthus annuus*. Elaboración propia, 2016.

La figura anterior muestra la producción promedio de número de hojas. Esta producción es muy similar en todos los tratamientos, sin embargo, el T2 tuvo la producción más baja, este tratamiento corresponde a la concentración de 300 mg/Kg de plomo inoculado con hongo micorrízico. Por lo tanto, se puede concluir que en este tratamiento el efecto del hongo, pudo retrasar el desarrollo foliar de la planta, lo cual

corresponde a una fase normal en el ciclo de la simbiosis, debido a que en ocasiones se ha encontrado una respuesta en las plantas similar a la que ocurre cuando entra en contacto con un patógeno (Camarena, 2012).

La longitud analizada con el software estadístico Statgraphics CENTURION XV.II, arrojó la siguiente gráfica:

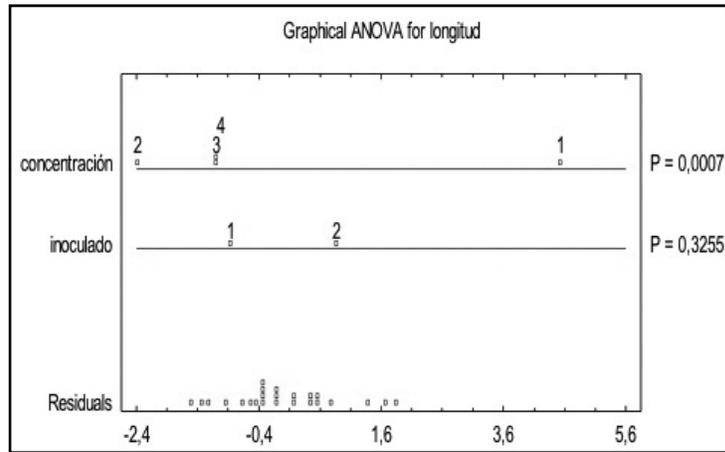


Figura 2. Análisis de la variable de longitud de tallo de las plantas *Helianthus annuus*. Elaboración propia, 2016.

Los valores P en la Figura 2, representan la prueba de significación estadística de los factores. Desde un valor P inferior a 0,05, tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre longitud. El nivel de confianza fue del 95%. Lo que indica que el inóculo no tuvo una intervención significativa en el crecimiento longitudinal del tallo de las plántulas. Sin embargo, la concentración del acetato de plomo representada por los números 1 (0 mg/Kg), 2 (300 mg/ Kg) ,3 (500 mg/Kg) y 4 (700 mg/Kg) de la variable concentración del contaminante, influyeron en el crecimiento significativamente.

Debido a la falta de nutrientes, las plantas adoptan diferentes mecanismos para aislar,

retener o incorporar los contaminantes a su metabolismo, esto puede verse reflejado en la detención de su crecimiento. Las plantas expuestas a las concentraciones de contaminante deben someterse a un proceso de asimilación al medio contaminado. (Posada, 2012). En González (2009), se obtuvo un diferencial de crecimiento en la variable longitud del tallo significativa. En la concentración más alta utilizada (700 mg/Kg), la disminución de altura referente al control fue evidente (concentración =700 mg/Kg Altura = 27, 33 cm; concentración = 0 mg/Kg Altura = 77,22 cm). Con lo que concluye que la concentración de plomo (Pb) afecto el desarrollo de la planta directamente.



Figura 3. Longitud de tallo de las plantas de *Helianthus annuus*. Análisis del comportamiento de la longitud de las plantas según los tratamientos. Elaboración propia, 2016.

Los tratamientos en la Figura 3 con valores mayores son T1 y T5, que corresponden a la concentración de 0 mg/Kg de plomo. El T1, con el mayor crecimiento durante el desarrollo de las plantas, fue inoculado con hongos micorrízicos arbusculares. Aunque, el hongo se comporta como parásito durante las primeras semanas de inoculación y tiende a disminuir el crecimiento de las plantas, no tuvo una intervención deletérea significativa en esta investigación.

En el caso de las demás variables, estadísticamente no fueron significativas, sin embargo, es importante analizar su comportamiento durante el desarrollo de la investigación. Para el caso del peso fresco y peso seco representado por la Figura 4, la P representó la significancia estadística, y esta es significativa cuando es inferior a 0,05, por lo tanto, en el análisis no representó significancia estadística.

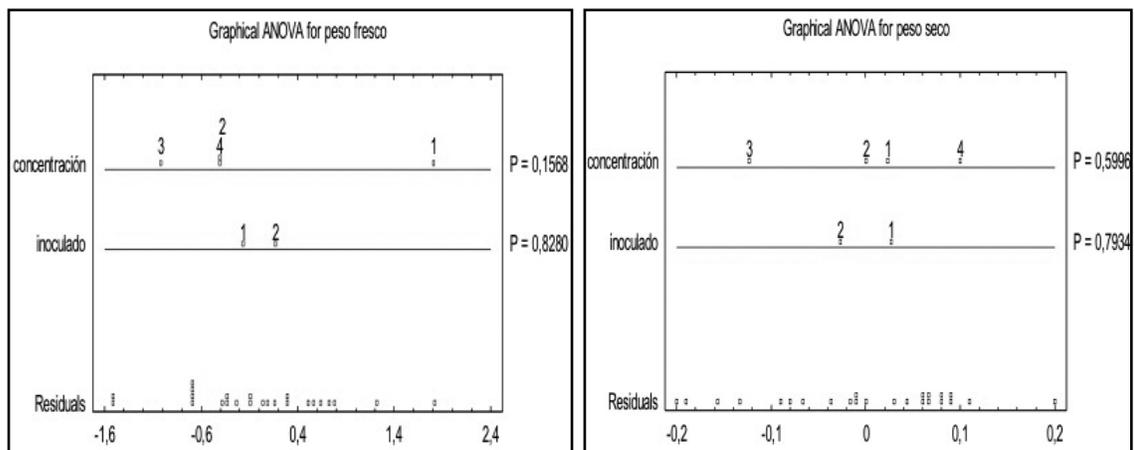


Figura 4. Comportamiento del peso fresco y peso seco de las plantas *Helianthus annuus*. Elaboración propia, 2016.

Sin embargo, es necesario analizar los pesos fresco y seco, debido a la producción de biomasa, un factor clave para los procesos de

fitorremediación y biorremediación. En la Figura 5, se representan las diferencias en los pesos.

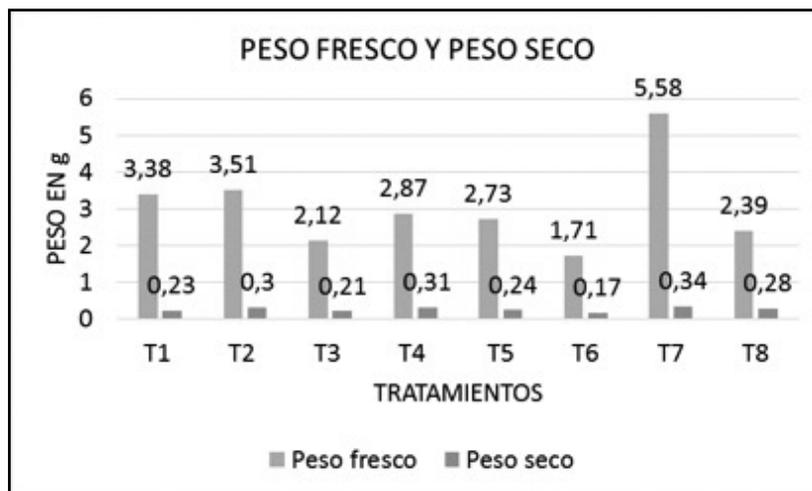


Figura 5. Peso fresco y peso seco de las plantas *Helianthus annuus*. Elaboración propia, 2016.

Se evidencia la producción de biomasa en los tratamientos. T4, corresponde a la concentración de 700 mg/Kg de plomo inoculado con micorriza arbuscular, al tener el peso mayor se clasifica como el tratamiento más eficiente teniendo en cuenta el parámetro de producción de biomasa. Se debe apreciar que durante el primer estadio de la planta inoculada con micorrizas arbusculares, su crecimiento es inhibido, debido a la demanda del hongo por carbohidratos y la falta de nutrientes aportados (Blanco, 2006). Teniendo presente lo anterior y de acuerdo con nuestros análisis de crecimiento y producción de biomasa, el hongo micorrízico no influyó en el crecimiento de la planta, debido a que no se produjeron especies enanas y la diferencia con los tratamientos que no recibieron inoculación no fue significativamente alta; sin embargo, no es una variable que se pueda dejar a un lado, ya que la asociación que tiene la raíz de *H. annuus* con los hongos micorrízicos fue positiva y eficiente, aún en presencia de acetato de plomo.

Un estudio reportado por Castañón, Vanegas, Lobos, & Gaete (2013), evalúa esta asociación simbiótica en presencia de cobre (Cu) como contaminante; concluye que, la asociación micorrizal favorece el crecimiento y la producción

de biomasa de plantas de *H. annuus*. Aunque en la investigación desarrollada por Castañón, Vanegas, Lobos, & Gaete (2013) se realizó con otro contaminante, es comparable, debido a que lo fundamental en la efectividad de la asociación micorrizal son las raíces de *H. annuus* en condiciones de toxicidad y sus beneficios en la planta.

Alteraciones morfológicas

Las plantas utilizadas en esta investigación, mostraron alteraciones morfológicas referidas a clorosis, quemaduras leves y deformaciones. Todos los tratamientos expuestos al contaminante revelaron clorosis, sin embargo, esta se manifestó en diferente medida, el tratamiento T2 y T3 que corresponden a las concentraciones de 300 y 500 mg/Kg de plomo e inoculados con hongos micorrízicos, respectivamente, manifestaron una clorosis leve, referida solo a algunas hojas y en una o dos de las tres plantas sembradas por unidad experimental. En comparación, en las plantas expuestas a una concentración de 700 mg/Kg de plomo (T4 y T7) manifestó una clorosis moderada, debido a que todas sus plantas presentaron la clorosis en la mayoría de sus hojas y adicionalmente, se presentó deformación foliar en algunas plántulas.

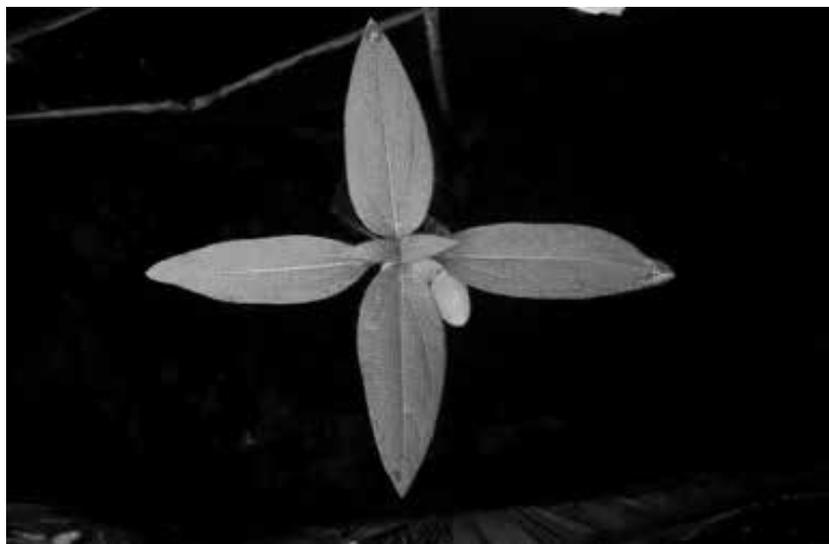


Figura 6. Desarrollo normal en plántula de *Helianthus annuus*, concentración 0 mg/Kg de plomo (T1). No se evidencian alteraciones. Elaboración propia, 2016.

En la Figura 6, se evidencia una planta con una coloración verde, sin presencia de manchas, deformaciones ni quemaduras, lo que indica

que en T1 y T5, con concentraciones de 0 mg/Kg de plomo, las plantas no expresaron alteraciones.



Figura 7. Plántula *Helianthus annuus* expuesta a una concentración de 700 mg/Kg de plomo (T8). Elaboración propia, 2016.

En la concentración de 700 mg/Kg de plomo (T4 y T8), se evidenció clorosis en las hojas de las plántulas (Figura 7), además de algunas

deformaciones expuestas en la Figura 7 y Figura 8.



Figura 8. Deformación foliar en plántulas de *Helianthus annuus* expuestas a una concentración de 700 mg/Kg de plomo (T4). Elaboración propia, 2016.

Uno de los síntomas específicos de la toxicidad del plomo (Pb) en las plantas es la clorosis en sus hojas (Alvarado, Dasgupta, Ambriz, Sánchez, & Villegas, 2011). Las plántulas experimentaron las alteraciones morfológicas independiente de la inoculación por lo tanto, se concluye que los hongos micorrízicos arbusculares no impiden la manifestación morfológica de la planta ante la exposición al contaminante y que este logró llegar a la planta y producir síntomas de fitotoxicidad (clorosis) en todos los tratamientos. Algunos estudios que han evaluado la germinación de *H. annuus* expuesto a concentraciones de plomo (Pb), concluyen que *H. annuus* se desarrolla en todos los niveles de concentración utilizados (Gutiérrez, y otros, 2011). Otro estudio que compara la adaptación de la planta a diferentes niveles

de concentración, concluyen que *H. annuus* no se ve afectado en presencia de plomo a concentraciones altas como 500 mg/Kg y 600 mg/Kg de plomo, y que las raíces secundarias son las que mayor concentración acumulan. Sin embargo, ninguno de estos estudios reporta alteraciones morfológicas como las vistas en las plantas utilizadas en esta investigación.

Colonización micorrizal.

La Figura 9, representa la colonización micorrizal en raíz de *H. annuus*, en el suelo sin presencia del contaminante. Indica que el hongo micorrízico tiene una buena asociación con la raíz de *H. annuus*. En la imagen A, se pueden diferenciar estructuras tipo vesículas en el interior de la raíz y tipo hifas en el exterior e interior de la misma.

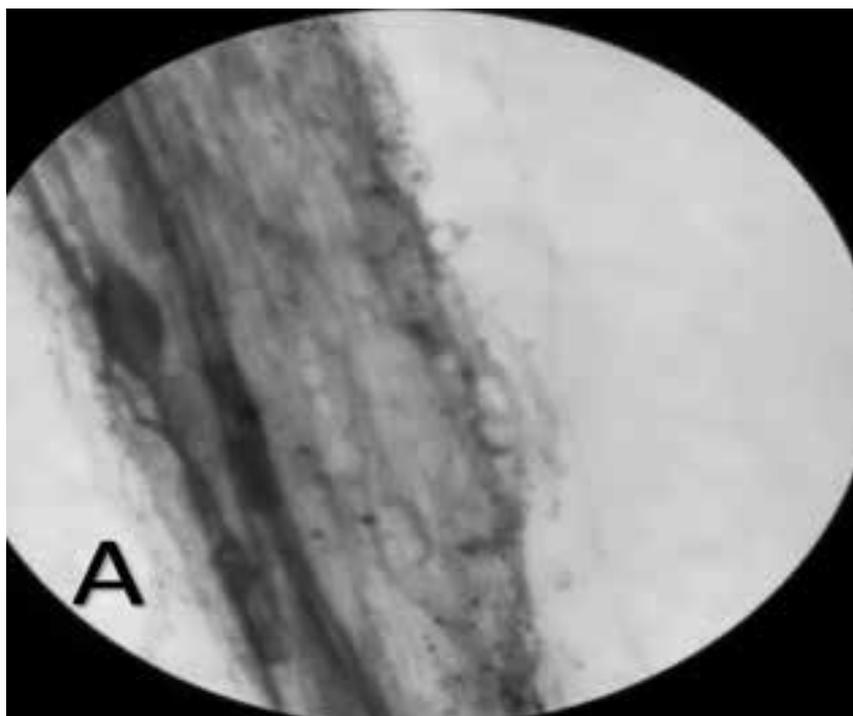


Figura 9. Colonización micorrizal con presencia de micelio y vesícula (A), en raíz de *Helianthus annuus* con concentración de 0 mg/Kg de plomo (T1), aumento 40X. Elaboración propia, 2016.

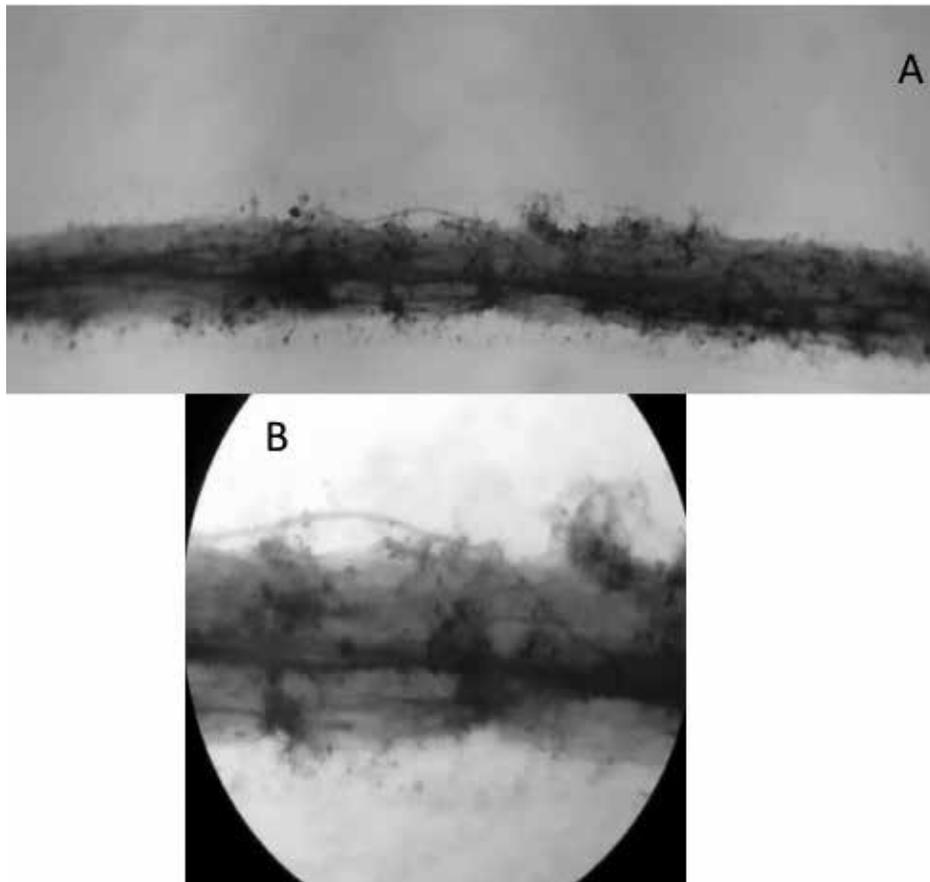


Figura 10. Colonización micorrizal con presencia de micelio (A-B), en raíz de *Helianthus annuus* con concentración de 300 mg/Kg de plomo (T2), aumento 10X (A) Y 40X (B). Elaboración propia, 2016.

En la Figura 10, se evidencia presencia de estructuras tipo hifas en el interior de la raíz de *H. annuus*. Esto garantiza la colonización micorrizal en la raíz de *H. annuus* sembrado en el suelo contaminado con 300 mg/Kg de plomo (T2). Se observa, una gran presencia de hifas intrarradiculares y extrarradiculares. La presencia de estas estructuras sustenta el éxito de la colonización micorrizal en este tratamiento (Hernández, y otros, 2003).

La Figura 11, representa el tratamiento con una concentración de 500 mg/Kg (T3). Se evidencia la presencia de hifas y de estructuras de tipo

vesículas, las cuales cumplen la función de almacenamiento de lípidos (Hernández, y otros, 2003). La fotografía A, representa la colonización de las hifas en el interior de la raíz de *H. annuus*; la fotografía B, expone las pocas estructuras que se manifiestan en el exterior de la raíz; la fotografía C representa las estructuras tipo vesículas en el interior de la raíz de *H. annuus*.

En T3, presentado en la Figura 11, la presencia de hifas es menor, y la presencia de vesículas es más abundante, comparado con el T2, expuesto en la Figura 10 En la Figura

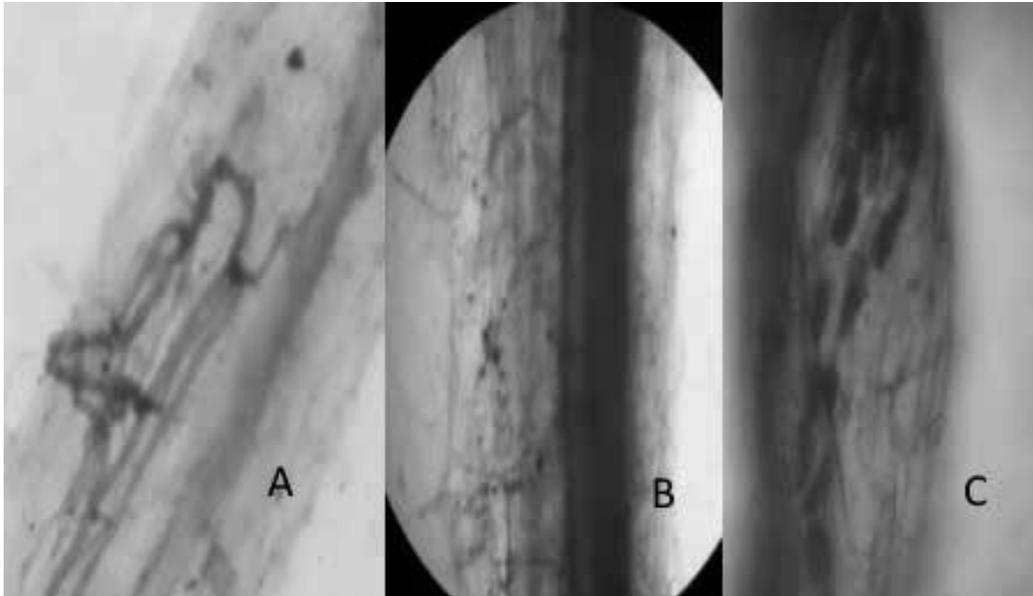


Figura 11. Colonización micorrizal con presencia de micelio (A-B) y vesículas (C), en raíz de *Helianthus annuus* con concentración de 500 mg/Kg de plomo (T3) Aumento 40X. Elaboración propia, 2016.

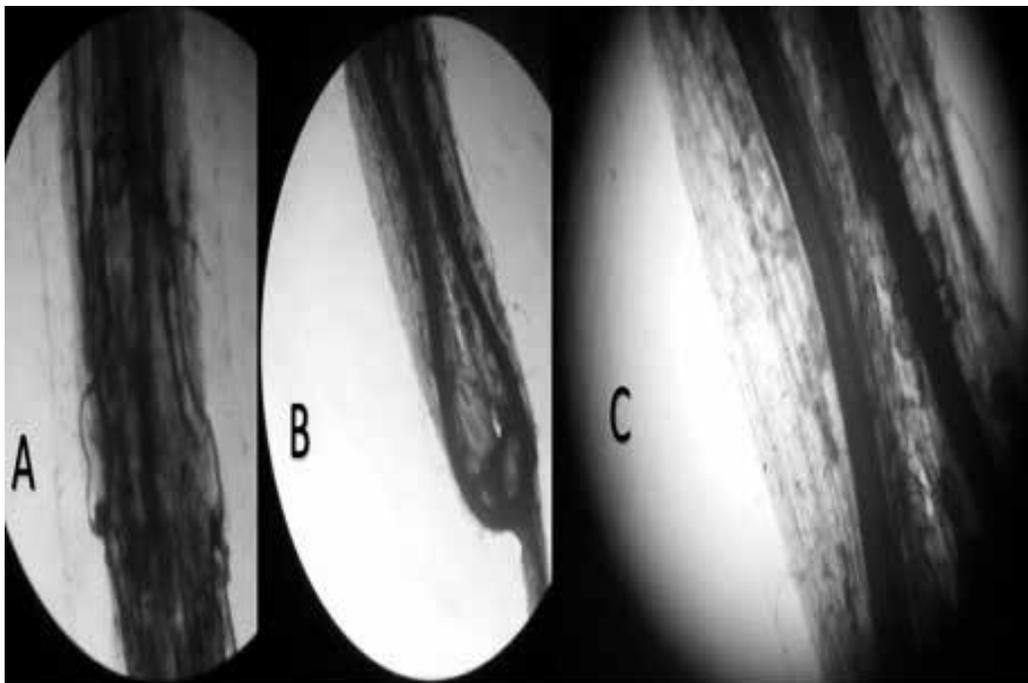


Figura 12. Colonización micorrizal con presencia de micelio (A) y vesículas (B-C), en raíz de *Helianthus annuus* con concentración de 700 mg/Kg de plomo (T4). Aumento 10X (A-B) y 40X(C). Elaboración propia, 2016.



En la Figura 12, T4, se evidencia la presencia de estructuras tipo vesículas, y muy pocas estructuras tipo hifas en el exterior de la raíz de *H. annuus*. Este tratamiento, manejó la concentración más alta utilizada en la investigación y sustenta la adaptación que tienen los hongos micorrízicos arbusculares a medios contaminados con plomo.

Realizando una comparación entre los cuatro tratamientos inoculados con micorrizas y contaminados con las diferentes concentraciones de plomo (0 mg/Kg (T1), 300mg/Kg (T2), 500 mg/Kg (T3) y 700mg/Kg (T4)), podemos evidenciar la presencia de diferentes estructuras desarrolladas al interior de la raíz. Esto podría sugerir que la concentración de plomo afecta el desarrollo del hongo y lo obliga a crear estructuras de reserva como las vesículas, con el fin de soportar los niveles de estrés al que está expuesto; por ello, se encontraron una mayor cantidad de estructuras tipo vesículas en los tratamientos con concentraciones más altas, 500 mg/Kg (T3) y 700 mg/Kg (T4), y menor cantidad en los tratamientos de 0 mg/Kg (T1) y de 300 mg/Kg (T2). Cabe resaltar que los análisis realizados en los tratamientos que no fueron inoculados con hongos micorrízicos (T5, T6, T7 Y T8), arrojaron resultados negativos acerca de la presencia del hongo, garantizando así que estos no fueron contaminados durante el proceso de siembra y montaje de la investigación.

Esporas

El conteo de esporas siguiendo el método de tamizado, centrifugación en gradiente de sacarosa y observación estereoscópica (Genderman y Nicolson, (1963) en Sieverding (1983), mostró que existe una mayor cantidad de esporas en el tratamiento con menos concentración del contaminante, 300 mg/Kg (T2).

Tabla 2. Resultado promedio del conteo de esporas

TRATAMIENTOS	NÚMERO DE ESPORAS
T1 (0 mg/Kg de Pb)	70
T2 (300 mg/Kg de Pb)	60
T3 (500 mg/Kg de Pb)	34
T4 (700 mg/Kg de Pb)	11

Elaboración propia, 2016.

La Tabla 2, muestra los resultados promedio de la observación estereoscópica a los tratamientos inoculados con micorriza.

Según la composición garantizada del producto, el inóculo tiene una composición mayor de 40 esporas. Sin embargo, en un conteo preliminar, se encontró un número de 180 esporas por gramo.

La disminución en la cantidad de esporas varía con las concentraciones de contaminante en el suelo, teniendo una menor cantidad de estas estructuras en la concentración de plomo 700 mg/Kg (T4). La producción de esporas puede entonces verse afectada por la concentración de plomo en el suelo, lo cual sugiere que puede ser necesaria una re-inoculación.

La Figura 13, muestra las esporas encontradas en los tratamientos.

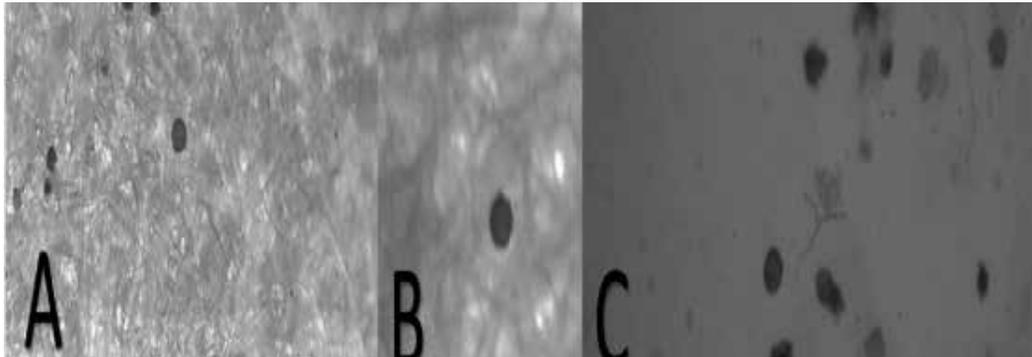


Figura 13. Esporas presentes en suelo inoculado. Concentración de 300 mg/Kg de plomo A (T2), 500 mg/Kg de plomo B (T3) y 0 mg/Kg de plomo C (T1), aumento 40X, observadas en estereoscopio. Elaboración propia, 2016.

Toma de medidas de pH.

El pH, es un factor determinante para el éxito de la fitorremediación, sin embargo, en esta investigación no se tomaron medidas para

su corrección. Los niveles encontrados al momento de la cosecha fueron graficados como lo muestra la Figura 14.

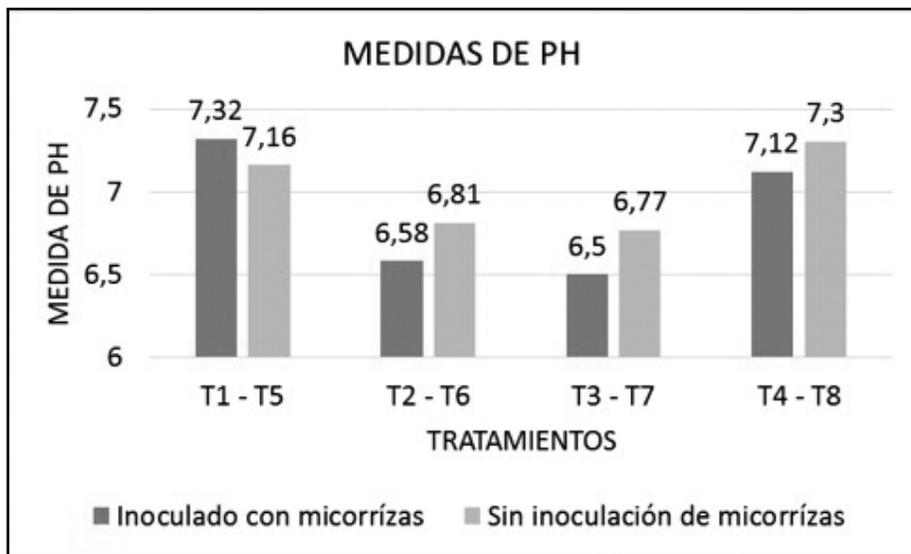


Figura 14. pH promedio de los tratamientos. Elaboración propia, 2016.

Los resultados comparados con el pH inicial obtenido de 5,69 (ácido), indican que el suelo sufrió una alteración al ser expuesto a las condiciones ambientales de la ciudad de Medellín, y al entrar en contacto con la solución contaminante. Por lo general, las concentraciones de metales pesados en la solución del suelo se pueden aumentar al disminuir el valor de pH del suelo, porque la cantidad de H⁺ aumentará y la capacidad

intercambiable entre cationes de metales pesados y H⁺ absorbido en la superficie de las partículas del suelo también aumentan después de que el pH disminuye (Sheoran, Sheoran, & Poonia, 2015). En la Figura 14, se evidencia que en los tratamientos T1 – T5, que poseen una concentración de 0 mg/ Kg de plomo, el pH se tornó neutral. Para los tratamientos T2 – T6 (300 mg/kg de plomo) y T3 – T7 (500 mg/Kg de plomo), el pH, aunque sigue clasificándose

como ácido, aumentó en relación con el pH inicial. Para la concentración más alta de plomo, en los tratamientos T4 – T8 (700 mg/Kg de plomo), el pH se neutraliza. Hornburg y Brummer (1993) en Sheoran, Sheoran, & Poonia (2015), informaron que las proporciones de plomo soluble aumentan fuertemente a medida que disminuye el pH por debajo de 3.5, y por encima de este valor, la solubilidad se controla. Se debe tener en cuenta, que para efectos de movilidad de plomo, el pH debe ser corregido a un nivel ácido (Sánchez, 2010).

Conclusiones

H. annuus, es una planta que demostró adaptarse a medios contaminados con plomo en concentraciones de 300, 500 y 700 mg/Kg. Sin embargo, manifiesta síntomas morfológicos como clorosis y deformaciones que indican la presencia del contaminante.

Los hongos micorrízicos arbusculares, pueden adaptarse a medios contaminados con plomo en concentraciones de 300, 500 y 700 mg/Kg de plomo. Estos organismos pueden colonizar las raíces de *H. annuus* y crear estructuras como hifas extrarradiculares e intrarradiculares y vesículas, que le permiten la captación y almacenamiento de nutrientes. Además, es capaz de desarrollar esporas, lo que garantiza su presencia en el tiempo.

El desarrollo de la planta se realizó bajo nivel de estrés y sin presencia de fertilizantes o enmiendas de suelo que permiten una mejor adaptación de esta. Por lo tanto, se sugiere que *H. annuus* es una planta que soporta no solo niveles altos de contaminantes como los utilizados en esta investigación, sino que tolera niveles extremos de déficit de nutrientes.

La producción de biomasa en las plantas de *H. annuus*, fue similar en todos los tratamientos, lo que indica que la asociación fue rápida, si se consideran las cuatro semanas de investigación.

Se recomienda continuar con el proceso investigativo y el análisis de las concentraciones de plomo que *H. annuus* es capaz de absorber en asocio con hongos micorrízicos.

Agradecimientos

Al grupo de investigación de la empresa Soluciones Biotecnológicas y agroambientales S.A.S y Abonamos S.A., coordinado por el Ingeniero Octavio González Murillo, por el aporte de inóculo micorrizal para la ejecución del trabajo de investigación.

Referencias

- Adams, A., Raman, A., & Hodkings, D. (2012). How do the plants used in phytoremediation in constructed wetlands, a sustainable remediation strategy, perform in heavy - metals - contaminated mine sites? *Water and environment journal*, 14.
- Aguilera, L., Olalde, V., Arriaga, R., & Contreras, R. (2007). Micorrizas Arbusculares. *Ciencia ergo sum*, 14(3), 300 - 306.
- Alvarado, C., Dasgupta, N., Ambriz, E., Sánchez, J., & Villegas, J. (2011). Hongos Micorrízicos Arbusculares y la Fitorremediación de Plomo. *Rev. Int. Contam. Ambie*, 27(4), 357-364.
- Blanco, D. (2006). Asociación simbiótica entre hongos formadores de micorrizas y plántulas de *Theobroma cacao* estimulada con la aplicación del isoflavonoide formononetina. *Bucaramanga: Universidad Industrial del Santander*.
- Carrillo, G., Juárez, J., Peralta, J., Gómez, E., Tiemann, K., Duarte, M., & Gardea, J. (2002). Alfalfa Growth Promotion by Bacteria Grown Under Iron Limiting Conditions. *Advances in Environmental Research*, 6, 391-399.
- Castañón, P., Vanegas, M., Lobos, M., & Gaete, H. (2013). Influencia de micorrizas arbusculares *Glomus* spp. en el crecimiento y acumulación de cobre en girasol *Helianthus annuus* L. *Agrociencia*, 47, 309-317.
- Chico, J., Cerna, L., Rodríguez, M., & Guerrero, M. (2012). Capacidad remediadora de la raíz de girasol, *Helianthus annuus*, cuando es sometida a diferentes concentraciones de plomo. *Revista Científica de la Facultad de Ciencia Biológicas Universidad Nacional de Trujillo*, 32(2), 13-19.

- Congreso de la República de Colombia . (2015). Proyecto de Ley 148 de 2015. .
- Díaz, M., Duarte, G., & Plante, E. (2003). El Cultivo de Girasol.
- European Environment Agency. (2013). Environment and human health. Luxemburgo: Publications office of the European Union .
- Galindo, A., & López, A. (2006). Efectos del sabor y del contenido calórico del agua sobre la conducta alimentaria durante un período de privación de comida en ratas albinas. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*, 32(2), 95-109.
- Gobernación de Antioquia . (2011 - 2020). Salud y ambiente . Obtenido de <http://diagnosticosalud.dssa.gov.co/>
- González, S. (2009). Adaptación del girasol (*Helianthus annuus* L.) al plomo aplicado a distintas dosis. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna . Torreón, Coahuila, México.
- Gutiérrez, L., Melgoza, A., Alarcón, M., Ortega, J., Prado, D., & Cedillo, M. (2011). Germinación del girasol silvestre (*Helianthus annuus* L.) en presencia de diferentes concentraciones de metales. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*, 2(1), 49 -56 .
- Gutjahr, C. (2014). Phytohormone signaling in arbuscular mycorrhiza development. *Current Opinion in Plant Biology*, 20, 26 - 34 .
- Hernández, L., Castillo, S., Guadarrama, P., Martínez, Y., Romero, M., & Sánchez, I. (2003). Hongos Micorrizógenos Arbusculares del Pedregal de San Ángel. Coordinación de Servicios Editoriales, Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- IDEAM. (s.f.). Características climatológicas de ciudades principales y municipios turísticos. Bogotá: autor.
- Johnson, F. (1997). The genetics effects of environmental lead. *Mutation Research*, 123-140.
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. (2012). Diagnóstico Nacional de Salud Ambiental . Bogotá: autor.
- Organización Mundial de la Salud. (2006). Colaboremos por la salud. Francia: autor.
- Pérez, A., Rojas, J., & Montes, D. (2011). Hongos formadores de micorrizas arbuscular: una alternativa biológica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el caribe colombiano. *Rev. Colombiana cienc. Anim*, 3(2), 20.
- Posada, R. (2012). Procesos de biorremediación . Universidad Nacional Abierta y a Distancia - UNAD Bogotá.
- Raskin, I., Smith, R., & Salt, D. (1997). Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current opinion in biotechnology*, 8, 221-226.
- Rueda, G., Rodríguez, J., & Madriñan, R. (2013). Metodología para establecer valores de referencia de metales pesados en suelos agrícolas: perspectivas para Colombia. *Acta agronómica*, 60(3), 203 - 218.
- Sánchez, M. (2010). Contaminación por Metales Pesados en el Botadero de Basuras de Moravia en Medellín: Transferencia a Flora y Fauna y Evaluación del Potencial Fitorremediador de Especies Nativas e Introducidas. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Sheoran, V., Sheoran, A., & Poonia , P. (2015). Factors Affecting Phytoextraction: A Review. *Pedosphere*, 26(2), 148 - 166 .
- Sieverding, E. (1983). Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo - arbuscular en el laboratorio. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Cali, Colombia..

- Singh, D., Vyas, P., Sahni, S., & Sangwan, P. (2015). Phytoremediation: A Biotechnological Intervention. En Springer, & G. Kaushik (Ed.), *Applied Environmental Biotechnology* (pág. 59). New Delhi:.
- US Environmental Protection Agency . (Septiembre de 2016). Remediation technology descriptions for cleaning up contaminated sites. Obtenido de <https://www.epa.gov/remedytech/remediation-technology-descriptions-cleaning-contaminated-sites>
- Vierheilig, H., Coughlan, A., Wyss, U., & Piché, Y. (1998). Ink and Vinegar, a Simple Staining Technique for Arbuscular - Mycorrhizal Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 5004-5007.
- Wainwright, M. (1999). *An introduction to environmental biotechnology*. Kluwer Academic Publisher. New York.
- World Health Organization. (2003). *The world health report shaping the future* . WHO Library Cataloguing-in—Publicación Data. Geneva Switzerland.
- Zapata, F., & Ávila, C. (2014). Bioabsorción de cobre (III) en soluciones acuosas con *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Facultad de Ciencias Foreces y de la Salud*(10), 155-162.