



Efecto del plomo y cobre en los cambios de color y crecimiento de la raíz y tallo de *Spilanthes urens* en condiciones de laboratorio

Effect of lead and copper on color changes and growth of the roots and stems of *Spilanthes urens* under laboratory conditions

Santos E. Padilla-Sagástegui y Chris C. Valderrama-Pereyra

Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú

RESUMEN

El efecto de metales pesados sobre los sistemas biológicos ha sido ampliamente abordado. En la presente investigación se evaluó el efecto en los cambios de color y crecimiento de *Spilanthes urens* estimulados por diferentes concentraciones de plomo (Pb) y cobre (Cu). Se utilizó un diseño experimental de estímulo creciente y selección simple al azar, distribuido en cinco tratamientos con diez repeticiones, en cuyas unidades experimentales se procesaron los análisis químicos siguiendo la metodología de Bunsen y Kirchhoff y la calificación de Likert. Los datos fueron sometidos al análisis de varianza y regresión lineal simple. Se encontró que existe diferencias entre las concentraciones de Pb y Cu aplicados en el diseño experimental; diferencias significativas entre tratamientos, metales, tiempo transcurrido y partes de la planta; asimismo, que no existe relación causa-efecto entre la influencia de los elementos químicos y el crecimiento de las partes de la planta, pero causa cambio de color en las raíces del vegetal. Se concluye que el Pb y el Cu causan cambios de color en las raíces y tallo durante el crecimiento de *S. urens*.

Palabra clave: Plomo, Cobre, cambio de color, *Spilanthes urens*

ABSTRACT

The effect of heavy metals on biological systems has been extensively addressed. In this research the effect on color changes and growth of *Spilanthes urens* stimulated by various concentrations of lead (Pb) and copper (Cu) was evaluated. An experimental design of increased stimulation, simple random selection, distributed in five treatments with ten repetitions, whose experimental units chemical analyzes were processed following the methodology of Bunsen and Kirchhoff and Likert rating was used. Data were subjected to analysis of variance and linear regression. It was found that there is difference between the concentrations of Pb and Cu used in experimental design; significant differences between treatments, metals, elapsed time and plant parts; also, that there is no causal link between the influence of the chemical elements and growth of the parts of the plant, but cause color change in the roots of the plant. It was concluded that Pb and Cu cause color changes in the roots and stems during the growth of *S. urens*.

Keyword: Lead, Copper, color change, *Spilanthes urens*

INTRODUCCIÓN

Los metales pesados se encuentran generalmente como componentes naturales de la corteza terrestre, en forma de minerales, sales u otros compuestos por tiempos indefinidos y no se degradan ni destruyen fácilmente de forma natural o biológica, ya que no tienen funciones metabólicas específicas para los seres vivos¹.

Entre los elementos químicos existentes, los metales pesados son peligrosos porque tienden a bioacumularse en diferentes seres vivos, siendo de especial trascendencia los cultivos agrícolas, porque significan una pérdida de calidad del producto y de todo el organismo en cierto periodo de tiempo, comparada a la concentración de dicho producto químico en el ambiente²; a la vez que en proporciones diversas, se pueden incorporar a otros organismos vivos (plantas y animales) por vía del alimento, agua y aire como medios de traslocación, dependiendo de su movilidad en dichos medios³.

En algunos casos, muchos metales pesados se encuentran en pequeñas cantidades (traza), como cobre (Cu), selenio (Se) y zinc (Zn) y son esenciales para mantener un correcto metabolismo en los seres vivos y en particular en el cuerpo humano; sin embargo, en concentraciones más altas pueden causar alteraciones metabólicas o conducir al envenenamiento⁴.

Existen estudios tendientes a resolver la contaminación originada por metales pesados en suelos y agua, mediante estrategias basadas en el uso de plantas que tienen la propiedad de acumular metales pesados; este proceso denominado “fitorremediación” consiste en la remoción, transferencia, estabilización y/o degradación y neutralización de compuestos orgánicos, inorgánicos y radioactivos que resultan tóxicos en suelos y agua, como es el caso de los estudios de extracción de cadmio y plomo en plantas de *Nicotiana tabacum* “tabaco”⁵; al mismo tiempo, se ha observado que algunas especies de plantas tienen ventajas sobre otros organismos biológicos por la capacidad de almacenamiento en la semilla, aspecto que, no obstante, está sujeto a variaciones de costos de mantenimiento, conservación de ejemplares biológicos con aporte e las condiciones físicas, químicas y biológicas; así, se ha utilizado a la cebolla, *Allium cepa* (Liliaceae), la betarraga, *Beta vulgaris* (Chenopodiaceae), el arroz, *Oriza sativa* (Poaceae) y el rabanito, *Raphanus sativus* (Brassicaceae) para evaluar la toxicidad y el riesgo de sustancias químicas peligrosas en el ambiente, con resultados favorables⁶; sin embargo, el efecto de metales pesados sobre plantas vasculares poco se conoce, pero se han experimentado algunos aspectos de la ecotoxicidad de metales pesados empleando bioensayos sencillos y prácticos para catalogar toxicológicamente muestras ambientales contaminadas por plomo (Pb), mercurio y cromo, y al determinar los riesgos, han contribuido a tomar medidas para evaluar la perturbación de los ecosistemas y promover alternativas de biorremediación⁷.

La sensibilidad de las especies vegetales a los metales pesados varía considerablemente a través de reinos y familias, siendo las plantas vasculares ligeramente más tolerantes, aspecto que puede ser atribuido a factores genéticos y fisiológicos; por ejemplo, se ha demostrado el efecto del plomo en la reducción del crecimiento radicular y la frecuencia de células mitóticas y células aberrantes en cebolla, *A. cepa*^{7,8,9}. En efecto, varios autores afirman que el Pb puede causar diversos daños a las plantas y en diferentes grados de acumulación; sin embargo, en algunas especies, la acumulación se produce a medida que se aumenta las dosis en el suelo hasta niveles menores a 1000 mg por Kg-1 de suelo a la vez que tiende a incrementarse rápidamente en los órganos de la planta hasta llegar a condiciones que no es tolerable y mueren, debido a que los mecanismos de fitotoxicidad están relacionadas con la permeabilidad de la membrana celular, reacciones de grupos sulfhidrilos (-SH) con cationes y afinidad para reaccionar con grupos fosfatos^{4,5,10}.

Dados a los antecedentes que explican la importancia de las especies vegetales que acumulan elementos químicos y la frecuente acumulación de metales pesados en agua y suelos agrícolas, es que se plantea la necesidad de hacer nuevas experiencias utilizando plantas silvestres existentes en nuestro medio, como *Spilathes urens*, con el objetivo determinar el efecto del plomo y cobre en los cambios de color y crecimiento de la raíz y tallo en condiciones de laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Estuvo constituido por *Spilanthes urens* “turre macho”. Se tomó como población a todas las plantas encontradas durante una inspección generalizada en campo abierto, de donde se obtuvo la muestra en forma aleatoria hasta completar 100 unidades, las mismas que fueron trasladadas al laboratorio en condición de planta adulta en baldes de cuatro litros de capacidad con agua potable al laboratorio de Ecología y Medio Ambiente, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo; para su aclimatación y adaptación con la perspectiva de evitar el estado de estrés¹¹.

El proceso de adaptación y aclimatación se realizó colocando los ejemplares en acuarios de vidrios de cinco litros de capacidad durante 15 días; haciendo el cambio de agua potable con frecuencia inter diaria, manteniéndose con iluminación constante haciendo uso de cuatro fluorescentes de 40 w, a fin de simular su medio natural, cuyas condiciones fueron demostradas cuando los ejemplares conservaron su color verde intenso, que sirvieron para el proceso experimental, de donde se utilizaron los brotes axilares que fueron aislados y colocados en vasos de material acrílico de 100 mL de capacidad dispuestos en el diseño experimental¹².

Para las pruebas experimentales, se prepararon soluciones patrón de plomo utilizando el nitrato de plomo [Pb(NO₃)₂] y cobre a partir de sulfato de cobre [Cu₂(SO₄)] a 1000 ppm, teniendo como referencia el peso molecular, con la finalidad de hacer las diluciones correspondientes y disponerlos en el diseño experimental de estímulo creciente organizado en tratamientos de 0; 25; 50; 75 y 100 ppm con diez repeticiones, para tomar los datos referidos a las medidas de la longitud de raíces y tallos un día antes de iniciar el agregado de plomo y cobre a las plántulas, utilizando un vernier mecánico y hacer las observaciones y evaluaciones cualitativas de cambios de color, tomando como modelo la calificación de la Escala de Likert; utilizando la tabla de evaluación con la referencia de los ítems y criterios valorados de 1 al 5, con grado de desacuerdo y acuerdo, para obtener la suma de puntuaciones de cada muestra y correlación de cada ítem, para asegurar la precisión y fiabilidad de la escala¹³. Asimismo, se desarrolló el criterio de consistencia interna, que consistió en seleccionar el 25 % de las muestras con puntuaciones máximas y el 25 % con puntuaciones mínimas, además de evaluar la diferencia de promedios de cada ítem y para realizar la escala se escogieron valores máximos de la diferencia de promedios y valores mayores a 0,20 para los análisis de correlación¹⁴. Con los datos obtenidos, se procesó el análisis de varianza para la regresión lineal simple por el método de los mínimos cuadrados, a fin de comprobar si los elementos químicos acumulados son causantes del efecto sobre el crecimiento de las raíces y tallos de *S. urens*, cuyo estimador del intersección fue:

$$a = \bar{y} - b \bar{x},$$

$$\text{y la pendiente } b = \frac{\sum xy - \frac{\sum y \sum x}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}},$$

dónde: a, es el intercepto del efecto en eje “y”; b, la pendiente de la curva de regresión. Para la evaluación, de los criterios cualitativos se utilizó la Escala de Likert (Tabla 1), que permitió disponer valores a los cambios de color en la raíz y tallo de *S. urens*, durante los 15 días de exposición a los metales¹⁵.

RESULTADOS

En la Tabla 2 se presenta el análisis de varianza para determinar la diferencia significativa entre los tratamientos, partes de la planta, metales y tiempos de exposición; en la Tabla 3, la comparación de promedios de la longitud de la raíz y tallo de *Spilanthus urens*, a los 15 días de tratamiento usando el método de la Mínima Diferencia Significativa Honesta con valor referencial $D= 0,12$; en la Tabla 4, el análisis de varianza de la regresión lineal, en las Tablas 5 y 6, las escalas de calificación para los cambios de color y crecimiento durante los 15 días de tratamiento, que nos permite establecer referencias y calificaciones cualitativas al observar los cambios en el color de la raíz y el tallo.

Tabla 1. Presentación de ítems de calificación de acuerdo a la escala de Likert (1997), sugerida por Ruiz (1998).

Items o criterios	Puntuaciones				
	1	2	3	4	5
B Cambio de color raíz (severo)					
C Crecimiento longitud de raíz.					
D Crecimiento de raíces secundarias					
E Cambio de color de hojas apicales					
F Cambio de forma de cotiledones					
G Cambio de forma de las hojas apicales					
H Estrangulamiento del tallo					
I Engrosamiento del tallo					
J Aparición de nuevas raíces					
K Aumento de biomasa de raíz					
L Crecimiento de longitud de parte aérea (tallo y hojas)					
M Cambio de color de hojas					
N Aumento de biomasa de parte aérea (tallo y hojas)					
O Aumento del tiempo de germinación					
P Aumento del número de mortalidad					

*1= totalmente en desacuerdo, 2= en desacuerdo, 3= indiferente, 4= de acuerdo, 5= totalmente de acuerdo

Tabla 2: Análisis de varianza de las medidas de longitud y concentraciones acumuladas en la raíz y el tallo de *Spilanthus urens* sometidos a cinco tratamientos diferentes de plomo y cobre durante 15 días.

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fc	Ft
Tratamiento	4000,90	4	1000,22	39,80	2,40 *
Partes de planta	93,89	1	93,89	3,74	3,87
Metales	4845,70	1	4845,71	193,00	3,87 *
Tiempos	554,13	1	554,13	22,10	3,87 *
Repeticiones	7,09	9	0,78	0,03	1,91
Error	316,83	383	0,83		
Total	9818,50	399			

(*)Significancia

DISCUSIÓN

El análisis de varianza (tabla 1), explica la diferencia del valor estimado del cuadrado medio del error, menor que las fuentes de variación (tratamientos, metales, tiempos y partes de la planta); lo que permite deducir que durante el proceso experimental los datos se han obtenido en óptimas condiciones, por lo tanto son confiables para demostrar diferencias significativas desde el punto de vista estadístico, confirmando con el valor Fisher (Fc) calculado mayor que el valor Fisher (Ft) tabulado; a diferencia de las repeticiones y partes de la planta que el Fc es menor que Ft; lo que significa que no hay diferencia significativa; es decir, que cada una de las unidades experimentales fueron dispuestas, procesadas y evaluadas en las mismas condiciones, lo cual concuerda con el estudio realizado por Christie y Chen¹⁶, que trabajaron con *Helianthus annuus* L. tratados con cadmio, zinc y plomo en similares condiciones, y que demostraron que dichos elementos se acumulan en mayor concentración en las raíces que en los brotes.

Tabla 3: Prueba de comparación de medias por el método de la Mínima Diferencia Significativa Honesta, para la longitud de raíz y tallo de *Spilanthes urens* sometidos a tratamientos diferentes de cobre durante 15 días (D=0,12).

Parámetros de evaluación		Promedio	Significancia
Tratamientos (cm)	T3 (50 ppm)	4,48	X
	T2 (25 ppm)	4,56	X
	T5 (100 ppm)	4,62	X
	T1 (0 ppm)	4,71	X
	T4 (75 ppm)	5,19	X
Tiempos	Después	4,63	X
	Antes	4,79	X
Metales	Cobre	4,71	X
	Plomo	4,83	X

Tabla 4: Análisis de varianza de la regresión lineal de las medidas de longitud de la raíz y tallo de *Spilanthes urens* sometidos a cinco tratamientos diferentes de plomo y cobre durante 15 días.

	Fuentes de Variación	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Fc	Ft
Longitud de raíz (plomo)	Debido a la regresión	0,00025	1	0,00025	0,00285	10,12800
	Error	0,26283	3	0,08761		
	Variación total	0,26308	4	0,06577		
Longitud de tallo (plomo)	Debido a la regresión	0,30270	1	0,30270	2,43262	10,12800
	Error	0,37330	3	0,12443		
	Variación total	0,67600	4	0,16900		
Longitud de raíz (cobre)	Debido a la regresión	0,00600	1	0,00600	0,01600	10,12800
	Error	1,26400	3	0,42100		
	Variación total	1,27000	4	0,31700		
Longitud de tallo (cobre)	Debido a la regresión	0,84100	1	0,84100	4,27685	10,12800
	Error	0,58992	3	0,19664		
	Variación total	1,43092	4	0,35773		

La comparación de los tratamientos, tiempos y metales presentados en lo tabla 2, tiene especial importancia, puesto que indica que los tratamientos, tiempos y metales tienen diferencia significativa; es decir que la acumulación de plomo y cobre en la raíz y tallo de la planta no es la misma y tiene tendencia a aumentar en relación directa con el incremento de los elementos químicos aplicados; es decir que la

eficiencia de la raíz y el tallo de *S. urens* es más eficaz a medida que aumenta las concentraciones de exposición, cuyos resultados son similares a un estudio anterior en el cual se observaron que la acumulación de plomo en tejidos aumentó junto con el incremento del mismo en el medio de cultivo¹⁷.

Con el análisis de regresión lineal, para asegurar la relación causa-efecto entre los elementos químicos y el crecimiento de las partes de la planta, se demuestra que dichos valores son totalmente independientes; es decir que el crecimiento de la raíz y tallo, no tienen relación con el plomo o con el cobre aplicado durante los tratamientos, confirmando los reportes de Valles y Alarcón¹⁸ quienes afirma que la longitud de la raíz de *H. annuus* no se ve afectada cuando se aumenta la concentración de plomo, sosteniendo que a concentraciones de 500 μM , la longitud de la raíz, es el doble que del control; aunque existe una ligera diferencia entre el peso de las raíces finas (diámetros menores a 2 mm) y las raíces gruesas.

Con la finalidad de conocer la respuesta del estímulo de plomo y cobre, se realizaron evaluaciones cualitativas, tomando como modelo la escala de Likert, donde se evidenciaron que el plomo y del cobre producen cambios de color en la raíz y tallo de *S. urens*, lo cual concuerda con el estudio realizado anteriormente, donde se observaron que los metales pesados no afectan el crecimiento de las plantas por una disminución significativa del potencial osmótico del sustrato, sino por su propia toxicidad, pero un exceso de metales pesados o de sus quelatos solubles puede provocar una serie de alteraciones bioquímicas y fisiológicas, tal como ocurre con el plomo que causa alteraciones o síntomas de una inhibición del color y la forma de raíz, tallo y hojas, y que depende de ciertas especies de plantas, por lo que los valores de calificación es el resultado de los criterios de observación y el coeficiente de correlación (r) que cuando se acerca a 1, hay evidencias de que existe alta asociación entre los criterios evaluados y crecimiento en la planta, con 95% de confiabilidad, como sucedió en nuestra experiencia y confirmado con la desviación estándar que da referencia al porcentaje de promedios de cada criterio evaluado que se encuentra sobre el promedio de la escala, por lo tanto la mayoría de criterios calificados están de acuerdo y totalmente de acuerdo con los cambios observados durante la experiencia^{19,20}.

Tabla 5: Escala de Likert para medir los cambios de color y crecimiento en raíz y tallo de *Spilanthes urens* durante los 15 días de tratamiento con plomo (ppm), según los ítems y criterios establecidos.

Criterios de consistencia interna																											
25% máximo puntaje de calificación cualitativa												X- máx.	25% mínimo puntaje de calificación cualitativa												X min	X máx. - X min	r
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	21	22		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	31	32			
a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	3	3,7	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	1,8	1,8	0,91	
b	3	3	3	3	3	3	3	3	3	5	5	6,7	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3,2	3,4	
c	2	2	2	2	2	2	2	2	2	5	5	7,3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	5	5	3,3	4		
d	5	5	5	5	5	5	5	5	5	2	2	8,4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	3,6	4,8	0,94	
e	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9,3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	5,2	
f	5	5	5	5	5	5	5	5	5	1	1	12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	7	
g	5	5	5	5	5	5	5	5	5	1	1	16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7	8,5	0,98
Σ	26	26	26	26	26	26	26	26	26	18	18		13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	14	14			

Leyenda: Las letras indican el cambio de color y crecimiento de la raíz y el tallo: **a:** sin cambio (blanco). **b:** leve (crema y marrón). **c:** severo (negro). **d:** crecimiento de longitud de raíz y tallo. **e:** engrosamiento de raíz y tallo. **f:** aparición de nuevas raíces. **g:** aumento de biomasa en raíz y tallo. **X máx:** promedios máximos. **X min:** promedios mínimos, **r:** coeficiente de correlación.

Tabla 6: Escala de Likert para medir los cambios de color y crecimiento en raíz y tallo de *Spilanthus urens* durante los 15 días de tratamiento con cobre (ppm), según los ítems y criterios establecidos.

Criterios de consistencia interna																											
25% máximo puntaje de calificación cualitativa												X Ma x	25% mínimo puntaje de calificación cualitativa												X mi n	X Max - X min	r
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	21	22	3	32	33	34	35	36	37	38	39	40	11	12				
a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	2	2	4,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1,2	3,3	1
b	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	3,2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	3,2	0	
c	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	5	5	3,3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4,8	-1,5	
d	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	1	1	4,3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3,3	1
e	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
f	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	1	1	4,3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3,3	0,99
g	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	1	1	4,3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3,3	1
Σ	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	15	15		1	13	13	13	13	13	13	13	13	13	14	14		

Leyenda: Las letras indican el cambio de color y crecimiento de la raíz y el tallo: **a:** sin cambio (blanco). **b:** leve (crema y marrón). **c:** severo (negro). **d:** crecimiento de longitud de raíz y tallo. **e:** engrosamiento de raíz y tallo. **f:** aparición de nuevas raíces. **g:** aumento de biomasa en raíz y tallo. **X Max:** promedios máximos. **X min:** promedios mínimos, **r:** coeficiente de correlación.

CONCLUSIONES

- *Spilanthus urens* tiene la capacidad de acumular plomo y cobre en la raíz y tallo.
- Los elementos plomo y cobre no tienen influencia en el crecimiento de la raíz y tallo.
- Durante el proceso de acumulación de los elementos químicos, la planta sufre cambios de color en la raíz y tallo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abollino O, Aceto M, Malandrino M, Mentaste E, et al. Distribution and Mobility of Metals in Contaminated Sites. Chemometric Investigation of Pollutant Profiles. Environ Pollution 2002; 119: 177.
2. Angelova V, Ivanova R, Delibaltova V, Ivanov K. Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fiber crops (flax, cotton and hemp). Industrial Crops & Products 2004; 19: 197–205.
3. Lucho CA, Álvarez M, Beltrán RI, Prieto F, Poggi H. A multivariate analysis of the accumulation and fractionation of major and trace elements in agricultural soils in Hidalgo State, Mexico irrigated with raw wastewater. Environmental International, On Line: 0160-4120-D 2004 doi:10.1016/j.envint.2004.08.002.
4. Kabata A. Trace elements in soils and plants. 13th ed. Boca Ratón, USA: CRC Press, Inc. 2000.
5. Rodríguez-Ortiz JC, Valdez-Cepeda RD, Lara JL, Rodríguez H, et al. Soil Nitrogen fertilization effects on phytoextraction of Cd and Pb by tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Bioremediation J 2006; 10: 105-114
6. Iannacone J, Alvarino FL. Efecto ecotoxicológico de tres metales pesados sobre el crecimiento radicular de cuatro plantas vasculares. Agricultura Técnica (Chile) 2005; 65(2): 198-203.
7. Calow, P. 1993. Handbook of ecotoxicology. Vol. I. London, England: Blackwell Science Ltd. 1985.
8. Shanker, K, Mishra S, Srivastava S, Srivastava R, et al. Study of mercury-selenium (Hg-Se) interactions and their impact on Hg uptake by the radish (*Raphanus sativus*) plant. Food Chem Toxicol 1996; 34:883-886.
9. Rosa CEV, Sierra M, Radetski CM. Use of plant tests in the evaluation of textile effluent toxicity. Ecotoxicol Environ Res 1999; 2: 56-61.
10. Lerda D. The effect of lead on *Allium cepa* L. Mutation Res 1992; 281:89-92.
11. Llugany M, Tolrà R, Poschnrieder C, Barceló J. Hiperacumulación de metales: ¿Una ventaja para la planta y para el hombre? Ecosistemas 2007; 16(2): 4-9.
12. Wu J, Ding L. 2006. Study on treatment of polluted river water using pilot-scale surface flow constructed wetlands system. Environ. Pollut. Contr. China. 28:432–434.
13. Likert R. Frequency scales use fixed choice response formats and are designed to measure attitudes or opinions. USA. Disponible en <http://www.simplypsychology.org/likert-scale.html>. 1997.
14. Azadpour A, Matthews J. Remediation of metal contaminated sites using plants. Remediation, Irán 1996; 6: 1-18.
15. Ruíz C. Instrumentos de Investigación Educativa. Procedimientos para su Diseño y Validación. Venezuela: Ediciones CIDEA. 1998.
16. Christie P, Chen X. Arbuscular Mycorrhiza can depress translocation of zinc to Shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc plant and soil, China. Bioresour Technol 2004; 261(1-2): 209-217.
17. Lin J, Jiang W, Liu D. Accumulation of copper by roots, hypocotyls, cotyledons and leaves of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Bioresour Technol 2003; 86: 151-155.
18. Valles M, Alarcón M. *Heliantus Annus* en Suelos Contaminados con Metales Pesados. En: XVI Cong Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales. México D.F. 2008.
19. Antonovics J, Bradshaw A, Turner R. Heavy metals tolerance in plants. Adv Ecol Res 1985; 7: 1-85.
20. Burton K, Morgan E, Roig A. The influence of heavy metals on the growth of sitka-spruce in south wales forests. II Greenhouse experiments. Plant Soil 1984; 78: 271-282