

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

**Fitorremediación de suelos
contaminados con metales pesados.
Evaluación de especies nativas en la
Provincia de Córdoba**

por Biol. María Julieta Salazar

Directora: Dra. María Luisa Pignata
Codirector: Dr. Santiago María Reyna

Lugar de Trabajo:

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA. FACULTAD DE CIENCIAS
EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES. Cátedra de Química General.

CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS. INSTITUTO MULTIDISCIPLINARIO DE BIOLOGÍA
VEGETAL. Área Contaminación y Bioindicadores.



I M B I V

CONICET
U N C



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES.
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA.

Córdoba, Argentina
2014

Comisión asesora

Dra. Pignata, María Luisa. Cátedra de Química General Ciencias Biológicas - Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales - Universidad Nacional de Córdoba. Área Contaminación y Bioindicadores – Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV)-CCT Córdoba - CONICET

Dra. Monferran, Magdalena Victoria. Departamento de Bioquímica Clínica – Facultad de Ciencias Químicas – Universidad Nacional de Córdoba. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba - CCT-Córdoba – CONICET.

Dr. Donati, Edgardo Rubén. Cátedra de Introducción a la Química - Facultad de Ciencias Exactas - Universidad Nacional de La Plata. Centro de Investigaciones en Fermentaciones Industriales – CCT-La Plata – CONICET.

Defensa oral y pública

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Dedicatoria y Agradecimientos

Decenas de años, cientos de investigadores y miles de fracasos, a los que prefiero llamar intentos, toma la ciencia para conquistar cada una de sus victorias. Quizás hasta me esté quedando corta.

Cinco años, un becario, siempre acompañado por un equipo, y un puñado de intentos toma un doctorado.

Todo empieza con un plan, en el que parece que todo va a salir bien y que esto representará un avance para la ciencia. En esos cinco años la perspectiva va cambiando y hay días en que esto es abrumador. Pero si la perspectiva no cambiara no nos estaríamos formando, y estos cinco años son una etapa de formación. Hay días en que sabemos que somos uno más de esos miles de fracasos en el intento de conquistar conocimientos. Pero son estos miles de intentos fallidos los que abren el camino a alguno de esos cientos de investigadores. No pierdo de vista que no se llega a nada sin haberlo intentado, fracasado, corregido, mejorado y vuelto a intentar. Ojalá mi trabajo sea un pequeño grano de arena, relativamente bien pulido; y que en el futuro alguien pueda juntarlo con otros pequeños granos de arena, relativamente bien pulidos; y así armar un hermoso reloj. Mi dedicatoria es a la persona que haga eso, también mis agradecimientos.

Agradezco a la Universidad Nacional de Córdoba, que me ha formado en todas las instancias. Agradezco a la sociedad y el estado argentino por la educación pública. Agradezco al CONICET, por garantizarme la oportunidad de realizar un doctorado.

Agradezco a la Cátedra de Química General de la FCEFyN – UNC y al Área Contaminación y Bioindicadores del IMBiV – CONICET CCT Córdoba, por brindarme el espacio, los recursos, el apoyo, la instrucción, la colaboración y sobre todo el compañerismo y la amistad.

Agradezco a las instituciones que brindaron su apoyo mediante subsidios, FONCyT, SECyT.

Agradezco a mis directores por su visión, experiencia y conducción.

Agradezco a los miembros de mi comisión asesora de tesis y a los miembros del tribunal por el tiempo dedicado, el empeño y los valiosos aportes.

Agradezco al Dr. E.R. Donati y a la Lic. C.E. Bernardelli por recibirme e instruirme en el Centro de Investigación en Fermentaciones Industriales [CINDEFI], CCT-CONICET - La Plata, como por toda su colaboración en distintas instancias experimentales.

Agradezco al Laboratorio Nacional de Luz Sincrotron , Brasil; por facilitar el acceso al laboratorio y equipamientos necesarios para el análisis elemental por TXRF.

Agradezco a la empresa Green Quality (Chubut, Argentina) y a Juan Magri por aportar desinteresadamente los biofertilizantes utilizados durante los experimentos.

Agradezco a la empresa Científica Senna S.A. de C.V. (D.F., México) y al Lic. Gerardo Renteria por proveer desinteresadamente las cajas de petri cuadradas de acrílico utilizadas para montar las rizocajas, utilizadas durante los experimentos de invernadero.

Agradezco a mi hermano, el mejor ejemplo a seguir en lo académico y en la vida, por todos sus consejos, por señalarme el camino sin empujarme; y por aportar siempre la movilidad necesaria para realizar las tareas de campo.

Agradezco a mis padres por sembrar en mí la curiosidad, el espíritu crítico, el esfuerzo, la voluntad de hacer las cosas lo mejor posible y la capacidad de disfrutar del trabajo con alegría y satisfacción.

Listado de publicaciones derivadas de la tesis

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han sido publicados parcialmente en:

Salazar, M.J.; Pignata, M.L., 2014. Lead accumulation in plants grown in polluted soils. Screening of native species for phytoremediation. *Journal of Geochemical Exploration* 137, 29-36.

Salazar, M. J.; Rodriguez, J. H.; Vergara Cid, C.; Pignata, M. L. Interaction among Zn, Cu and Pb during Pb uptake by phytoextractors plants (*Bidens pilosa* L. and *Tagetes minuta* L.) from polluted soils. Aceptado para su publicación en “Applications of Synchrotron Radiation for Environmental and Earth Sciences, 2014”.

Salazar, M. J.; Rodriguez, J. H.; Vergara Cid, C.; Bernardelli, C. E.; Donati, E. R.; Pignata, M. L., 2014. Soil variables that determine lead accumulation in *Bidens pilosa* L. and *Tagetes minuta* L. grown in polluted soils. Pb, Zn and Cu interaction. *Journal of Hazardous Materials*. *Enviado para su publicación*.

Salazar, M. J.; Rodriguez, J. H.; Vergara Cid, C.; Pignata, M. L., 2014. Auxine application effect on Pb phytoextraction capabilities of *Bidens pilosa* L. and *Tagetes minuta* L. growing in polluted soils. *International Journal of Phytoremediation*. *Enviado para su publicación*.

Salazar, M. J.; Pignata, M. L., 2011. Assessment of native species for phytoremediation of lead polluted soils around a battery recycling plant in Argentina. Publicado en “International Phytotechnology Conference, Portland, U.S.A., October 2011”.

Salazar, M. J.; Vergara Cid, C.; Rodriguez, J. H.; Pignata, M. L., 2015. Efecto de auxinas sobre la eficiencia fitoextractora de plomo en *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa*. Aceptado para su publicación en “IV Congreso Iberoamericano y del Caribe de Restauración Ecológica, Buenos Aires, Argentina, Abril 2015”.

Salazar, M. J.; Vergara Cid, C.; Rodriguez, J. H.; Pignata, M. L., 2015. Efecto de biofertilizantes en el comportamiento radical de tres especies acumuladoras de Pb. Aceptado para su publicación en “IV Congreso Iberoamericano y del Caribe de Restauración Ecológica, Buenos Aires, Argentina, Abril 2015”.

Índice

Abreviaturas.....	1
Resumen	5
Abstract.....	7
Introducción.....	9
Contaminación de suelos superficiales por metales pesados	10
Origen y consecuencias de la contaminación de los suelos por metales pesados	11
Remediación de suelos contaminados con metales pesados	14
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	22
1. Capítulo I. Plomo total y móvil en suelos agrícolas y residenciales alrededor de una fundición recicladora de baterías en Bouwer, Córdoba.....	23
Resumen	24
1.1. Introducción.....	25
1.2. Materiales y Métodos.....	29
1.2.1. Área de estudio.....	29
1.2.2. Diseño de muestreo	30
1.2.3. Procedimiento de muestreo.....	31
1.2.4. Análisis Físicoquímicos.....	33
1.2.4.1. Conductividad eléctrica, pH y porcentaje de materia orgánica	33
1.2.4.2. Metales pesados extraíbles con HCl 0,5 M.....	33
1.2.4.3. Metales pesados pseudototales.....	34
1.2.5. Métodos estadísticos.....	35
1.3. Resultados y Discusión	35
1.3.1. Estadística descriptiva	35
1.3.2. Influencia de los vientos predominantes	42
1.3.3. Relación entre las concentraciones de metales en el suelo y la distancia a la fuente.....	43

1.3.4. Análisis de correlación	48
1.4. Conclusiones.....	49
2. Capítulo II. Acumulación de plomo en plantas silvestres que crecen en suelos contaminados. Relevamiento de especies nativas para fitorremediación.....	51
Resumen	52
2.1. Introducción.....	52
2.2. Materiales y Métodos.....	54
2.2.1. Área de estudio.....	54
2.2.2. Procedimiento de muestreo.....	57
2.2.3. Análisis físico-químicos	57
2.2.3.1. Conductividad eléctrica, pH y porcentaje de materia orgánica en los suelos superficiales	57
2.2.3.2. Metales pesados en suelos superficiales	58
2.2.3.3. Concentración de plomo en órganos vegetales	58
2.2.4. Control de calidad	58
2.2.5. Análisis de datos	59
2.2.5.1. Análisis estadísticos.....	59
2.2.5.2. Factores de translocación y bioacumulación	59
2.3. Resultados.....	60
2.3.1. Metales pesados en suelos	60
2.3.2. Evaluación de la capacidad fitoextractiva de las especies nativas.....	62
2.3.3. Concentración de Plomo en plantas	63
2.4. Discusión	67
2.4.1. Contenido de plomo en plantas	67
2.4.2. Relación entre las propiedades del suelo y la acumulación de plomo en las especies estudiadas.....	70
2.5. Conclusión	72
3. Capítulo III. Tolerancia y acumulación de Pb en <i>Tagetes minuta</i> L. y <i>Bidens pilosa</i> L. Determinación del tiempo óptimo de cultivo.	73
Resumen	74

3.1. Introducción.....	74
3.2. Materiales y Métodos.....	77
3.2.1. Obtención de los suelos	77
3.2.2. Obtención del material vegetal	77
3.2.3. Diseño experimental.....	78
3.2.4. Determinación de la concentración de Pb en órganos vegetales	78
3.2.5. Control de calidad	79
3.2.5.1. Análisis de datos.....	79
3.2.5.2. Análisis estadísticos.....	79
3.2.5.3. Factores de traslocación y extracción total	79
3.3. Resultados.....	80
3.3.1. <i>Tagetes minuta</i>	80
3.3.1.1. Crecimiento.....	80
3.3.1.2. Supervivencia.....	81
3.3.1.3. Producción de biomasa	82
3.3.1.4. Acumulación de Pb en raíz, tallo y hojas	84
3.3.1.5. Factores de Translocación	85
3.3.1.6. Capacidad Fitoextractora de plomo.....	86
3.3.2. <i>Bidens pilosa</i>	88
3.3.2.1. Crecimiento.....	88
3.3.2.2. Supervivencia.....	89
3.3.2.3. Producción de biomasa	91
3.3.2.4. Acumulación de Pb en raíz, tallo y hojas	93
3.3.2.5. Factores de Translocación	94
3.3.2.6. Capacidad fitoextractora de plomo.....	95
3.4. Discusión	97
3.5. Conclusiones.....	99

4. Capítulo IV. Comportamiento del sistema radical en relación a la extracción de Pb por <i>Bidens pilosa</i> , <i>Tagetes minuta</i> y <i>Brassica juncea</i> cuando crecen en suelos con elevadas concentraciones del metal en presencia de biofertilizantes	101
--	-----

Resumen	102
---------------	-----

4.1. Introducción.....	103
------------------------	-----

4.2. Materiales y Métodos.....	105
4.2.1. Preparación de los suelos.....	105
4.2.2. Características de los biofertilizantes empleados.....	105
4.2.3. Material vegetal.....	106
4.2.4. Diseño experimental.....	106
4.2.5. Determinación de la longitud de la raíz.....	107
4.2.6. Determinación de la concentración de Pb en órganos vegetales de plantas sometidas a distintos tratamientos en rizocajas	108
4.2.7. Control de calidad	108
4.2.8. Análisis de datos	110
4.2.8.1. Análisis estadísticos.....	110
4.2.8.2. Factores de translocación y fitoextracción de plomo	110
4.3. Resultados.....	110
4.3.1. Producción de Biomasa	110
4.3.2. Crecimiento radical	114
4.3.3. Concentración de plomo en la parte aérea de plantas de <i>T. minuta</i> , <i>B. pilosa</i> y <i>B. juncea</i>	119
4.3.4. Concentración de Pb en raíces de plantas de <i>T. minuta</i> , <i>B. pilosa</i> y <i>B. juncea</i>	122
4.3.5. Extracción total de Pb por planta y factor de translocación en <i>T. minuta</i> , <i>B. pilosa</i> y <i>B. juncea</i>	124
4.4. Discusión	127
4.5. Conclusión	132

5. Capítulo V. Influencia de microorganismos rizosféricos adaptados a suelos contaminados sobre la acumulación de Pb por *B. pilosa* y *T. minuta*.

Resumen	136
5.1. Introducción.....	137
5.2. Materiales y Métodos.....	138
5.2.1. Obtención de los suelos	138
5.2.2. Material vegetal.....	139
5.2.3. Diseño experimental.....	139
5.2.4. Determinación de la concentración de metales pesados en órganos vegetales.....	140
5.2.5. Control de calidad	140
5.2.6. Análisis de datos	141
5.2.6.1. Análisis estadísticos.....	141

5.2.6.2. Factor de bioacumulación, factor de translocación y fitoextracción de plomo	141
5.3. Resultados.....	142
5.3.1. Producción de Biomasa	142
5.3.2. Concentración de metales pesados en órganos vegetales de <i>T. minuta</i> y <i>B. pilosa</i> ..	143
5.3.3. Factores de Bioacumulación y Translocación	146
5.3.4. Extracción total por planta y órgano	149
5.4. Discusión	150
5.5. Conclusiones.....	153
6. Capítulo VI. Acumulación de Pb en <i>Bidens pilosa</i> y <i>Tagetes minuta</i> cuando crecen en suelos contaminados frente al agregado de Cu y Zn.....	155
Resumen	156
6.1. Introducción.....	157
6.2. Materiales y Métodos.....	159
6.2.1. Suelos	159
6.2.2. Material vegetal.....	159
6.2.3. Diseño experimental.....	160
6.2.4. Determinación de la concentración de metales pesados en órganos vegetales.....	160
6.2.5. Control de calidad	161
6.2.6. Análisis de datos	161
6.2.6.1. Análisis estadísticos.....	161
6.2.6.2. Factores de translocación y fitoextracción de plomo	161
6.3. Resultados.....	162
6.3.1. Biomasa	162
6.3.2. Concentración de Pb, Zn y Cu en los órganos vegetales.....	163
6.3.3. Factor de Translocación.....	168
6.3.4. Extracción de plomo por planta y por órgano.....	170
6.4. Discusión	172
6.5. Conclusión	174
7. Capítulo VII. Efecto de la aplicación de auxinas sobre la eficiencia fitoextractora de plomo en <i>Tagetes minuta</i> y <i>Bidens pilosa</i>.....	175

Resumen	176
7.1. Introducción.....	176
7.2. Materiales y Métodos.....	178
7.2.1. Suelos	178
7.2.2. Material vegetal.....	179
7.2.3. Diseño experimental.....	179
7.2.4. Determinación de la concentración de metales pesados en órganos vegetales.....	180
7.2.5. Determinación del poder extractivo de los exudados.....	180
7.2.6. Control de calidad	181
7.2.7. Análisis de datos	181
7.2.7.1. Análisis estadísticos.....	181
7.2.7.2. Factores de translocación y extracción total	182
7.3. Resultados y Discusión	182
7.3.1. Crecimiento.....	182
7.3.2. Concentración de Pb en plantas	191
7.3.3. Factor de translocación.....	193
7.3.4. Extracción total de Pb por planta y por órgano.....	194
7.3.5. Capacidad extractora de Pb de los exudados radicales de <i>T.minuta</i> y <i>B. pilosa</i>	196
7.4. Conclusiones.....	200

8. Capítulo VIII. Variables del suelo que determinan la acumulación de Pb en *Bidens pilosa* L. y *Tagetes minuta* L. cuando crecen en suelos contaminados. Interacción entre Pb, Zn y Cu en el sistema planta-suelo. 203

Resumen	204
8.1. Introducción.....	204
8.2. Materiales y métodos	207
8.2.1. Área de estudio.....	207
8.2.2. Procedimiento de muestreo.....	207
8.2.3. Análisis fisicoquímicos y microbiológicos.....	209
8.2.3.1. Conductividad eléctrica, pH, porcentaje de materia orgánica y tamaño de grano en suelos superficiales.....	209
8.2.3.2. Metales pesados en suelos superficiales	210
8.2.3.3. Diversidad bacteriana de los suelos.....	212
8.2.3.4. Concentración de metales pesados en las plantas	212

8.2.4. Análisis de los datos	213
8.2.4.1. Análisis estadísticos.....	213
8.2.4.2. Factores de translocación y bioacumulación	214
8.3. Resultados.....	214
8.3.1. Suelo	214
8.3.2. Biomasa y metales pesados en plantas	226
8.3.3. Factores de bioacumulación y de translocación.....	232
8.4. Discusión	236
8.5. Conclusiones.....	242
Discusión	243
Crecimiento y Biomasa	245
Concentración de Pb en Plantas y Extracción Neta.....	247
Conclusión.....	259
Bibliografía.....	263

Abreviaturas

TS: Transecta sur

TN: Transecta norte

TE: Transecta este

TO: Transecta oeste

CE: Conductividad eléctrica

%MO: Porcentaje de materia orgánica.

Cu_{HCl}, Pb_{HCl}, Fe_{HCl}, etc: concentración del elemento en la fracción extraíble con HCl 0,5M

Cu_{Hoja}, Pb_{Hoja}, Fe_{Hoja}, etc: concentración del elemento en hojas

Cu_{Tallo}, Pb_{Tallo}, Fe_{Tallo}, etc: concentración del elemento en tallos

Cu_{Raíz}, Pb_{Raíz}, Fe_{Raíz}, etc: concentración del elemento en raíces

Cu_{aéreo}, Pb_{aéreo}, Fe_{aéreo}, etc: concentración del elemento en la parte aérea de la planta

Pb1; Zn1; Cu1: Concentración de cada elemento en la fracción 1 del suelo (extracción secuencial).

Pb2; Zn2; Cu2: Concentración de cada elemento en la fracción 2 del suelo (extracción secuencial).

Pb3; Zn3; Cu3: Concentración de cada elemento en la fracción 3 del suelo (extracción secuencial).

Pb4; Zn4; Cu4: Concentración de cada elemento en la fracción 4 del suelo (extracción secuencial).

Pb5; Zn5; Cu5: Concentración de cada elemento en la fracción 5 del suelo (extracción secuencial).

GCS: Guía para la calidad de suelo

GCS-SA: Guía para la calidad de suelo para la salud ambiental.

PS: Peso seco

FT: Factor de translocación

FT R-T: Factor de translocación de raíz a tallo

FT T-H: Factor de translocación de tallo a hoja

FT R-A: Factor de translocación de raíz a parte aérea

FBC: Factor de bioacumulación

FTT: Factor de Transferencia Total

FTT R-A: Factor de Transferencia Total de raíz a parte aérea

FBE: Factor de Bioextracción

ET: Extracción total por planta

C_{aérea}: Concentración en parte aérea de la planta

C_{hoja}: Concentración en hojas

C_{tallo}: Concentración en tallos

BioM: biomasa

DS: desvío estándar

Triple: Tratamiento con biofertilizante triple (*Bradyrhizobium japonicum* + *Azospirillum brasilense* + *Pseudomonas fluorescens*)

Ab + Pf: Tratamiento con biofertilizante con *Azospirillum brasilense* + *Pseudomonas fluorescens*

Ab: Tratamiento con biofertilizante con *Azospirillum brasilense*

Pf: Tratamiento con biofertilizante con *Pseudomonas fluorescens*

C: Tratamiento Control

300: Tratamiento homogéneo con 300 mg Pb kg⁻¹ PS en suelo

600: Tratamiento homogéneo con 600 mg Pb kg⁻¹ PS en suelo

C-300: Tratamiento heterogéneo con suelo control y con suelo con 300 mg Pb kg⁻¹ PS

C-600: Tratamiento heterogéneo con suelo control y con suelo con 600 mg Pb kg⁻¹ PS

ns: diferencias estadísticamente no significativas (p>0,05)

2: Tratamiento realizado con suelo del sitio 2.

2+2: Tratamiento realizado con suelo del sitio 2, esterilizado y reinoculado con microorganismos del sitio 2.

2+5: Tratamiento realizado con suelo del sitio 2, esterilizado y reinoculado con microorganismos del sitio 5.

5: Tratamiento realizado con suelo del sitio 5.

5+5: Tratamiento realizado con suelo del sitio 5, esterilizado y reinoculado con microorganismos del sitio 5.

5+2: Tratamiento realizado con suelo del sitio 5, esterilizado y reinoculado con microorganismos del sitio 2.

Abreviaturas

T-Zn: Tratamiento realizado con suelo del sitio 5 enriquecido con Zn.

T-Cu: Tratamiento realizado con suelo del sitio 5 enriquecido con Cu.

Alta: Tratamiento realizado con suelo del sitio 5

Alta con auxinas: Tratamiento realizado con suelo del sitio 5 con adición de auxinas.

Media: Tratamiento realizado con suelo del sitio 2

Media con auxinas: Tratamiento realizado con suelo del sitio 2 con adición de auxinas.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

TXRF: Fluorescencia de rayos X, reflexión total

DGGE: Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante

OIEA UN: Organización Internacional de Energía Atómica, Naciones Unidas

Resumen

El objetivo de esta tesis fue desarrollar una metodología y aportar conocimientos que permitan aplicar técnicas de fitorremediación en el tratamiento de suelos contaminados con plomo, basadas en la evaluación y empleo de especies nativas que crecen en la provincia de Córdoba, Argentina. Con esta finalidad se evaluaron las características del suelo y la contaminación de este por metales pesados en un sitio afectado por actividades industriales. Allí se realizó un muestreo y evaluación de todas las especies nativas y silvestres presentes, seleccionándose por su respuesta (tolerancia y acumulación de Pb) a *Tagetes minuta* L. y *Bidens pilosa* L. como especies de interés. Se realizaron experimentos en invernadero a fin de profundizar el conocimiento sobre la incorporación y translocación de Pb, así como de los factores que podrían potenciarlo. Finalmente se estudió a campo el comportamiento de las variables estudiadas experimentalmente en invernadero y laboratorio.

T. minuta y *B. pilosa* mostraron mayor eficiencia en la extracción de Pb que la internacionalmente reconocida como fitoextractora *Brassica juncea*. El Pb extraído por estas especies se acumuló principalmente en la raíz y en el tallo. Los valores más elevados de extracción total de Pb por planta en *T. minuta* y *B. pilosa* se encontraron en los estudios a campo, indicando que estas especies se comportan mejor como fitoextractoras en situaciones reales que en las experimentales. Las variables relacionadas con la acumulación de Pb en las plantas fueron la concentración de plomo en suelo, así como la concentración de Zn y Cu en suelo y plantas. El Zn estuvo directamente asociado con la incorporación y translocación de Pb, mientras que el Cu mostró fenómenos de competencia con el Pb.

La variabilidad de respuesta entre individuos fue sorprendentemente elevada, siendo recomendable seleccionar un linaje de semillas de cada especie proveniente de plantas que presenten mayor eficiencia fitoextractora de Pb. Esto permitiría mejorar la extracción de Pb de suelos y estudiar los mecanismos fisiológicos implicados (tolerancia, detoxificación, sistemas de transporte y translocación, etc.).

Los resultados obtenidos muestran la necesidad de ampliar el enfoque en las investigaciones sobre fitorremediación, integrando datos de concentración y biomasa en una tasa de extracción neta que indique eficacia y eficiencia de extracción de un metal,

criterios no considerados en los índices que fijan los factores de acumulación tradicional. En este contexto se proponen dos nuevos factores que representan un nuevo enfoque en el estudio de la eficiencia de plantas que se emplean en fitorremediación: el factor de transferencia total y el factor de bioextracción.

Abstract

The aim of this thesis was to develop a methodology for phytoremediation of lead contaminated soils, based on the evaluation and use of native species growing in the province of Cordoba, Argentina. Soil characteristics and heavy metal pollution were evaluated at a site affected by industrial activities. There, we evaluated native and wild species, being selected *Tagetes minuta* L. and *Bidens pilosa* L. as a species of concern. Greenhouse experiments were conducted to increase the extraction and deepen the knowledge about the uptake and translocation of Pb. Finally we studied the behavior in the field of the variables addressed experimentally in the greenhouse.

Tagetes minuta and *Bidens pilosa* showed higher extraction efficiency of Pb than the internationally recognized as phytoextractor, *Brassica juncea*. Pb extracted by these species is accumulated in the root and shoot. The highest values of total removal of Pb by plant for *B. pilosa* and *T. minuta* were found in field studies, indicating that they behave better in real situations than in experimental ones. Variables responsible for Pb accumulation in plants were soil lead concentration and other metals in soil and plants such as Zn and Cu. Zn is necessary to incorporate and translocate Pb, whereas Cu showed competition with Pb.

The variability of response between individuals was surprisingly high, being recommended to select a line of seeds of each species that presents greater efficiency extracting Pb. This would improve the extraction of Pb and allow to study the physiological mechanisms (tolerance, detoxification, transport and translocation systems, etc.).

The results show the need to broaden the focus in research on phytoremediation, integrating data about biomass production and concentration indicating net extraction efficiency and effectiveness, and not focus solely on the traditional criterion of accumulation. In this context, two new factors to acquire such an approach are proposed: total transfer factor and bioextraction factor.

Introducción

La vida se desarrolla en una fracción relativamente pequeña de nuestro planeta, a la cual denominamos biósfera. Esta comprende la capa superficial de la Tierra y se define como la frágil zona que es capaz de mantener la vida. Como tal, se compone de diversos sistemas, los que son absolutamente necesarios para su mantenimiento y que incluyen la materia viva, la materia biogénica, la materia inerte, y la materia bioinerte (Ghilarov, 1995).

El suelo es un claro componente de la materia bioinerte, ya que es producto de la actividad y de la presencia de organismos, al mismo tiempo que de fenómenos físico-químicos que han tenido, y tienen, lugar en él a lo largo de mucho tiempo. En este tipo de materia ocurren la mayor cantidad de interacciones entre lo vivo y lo no vivo, permitiendo a los organismos obtener los recursos que aseguren su supervivencia. Esto demuestra la importancia del suelo en el sostenimiento de la vida, la complejidad del mismo y la de sus interacciones con el resto de la biósfera. Al mismo tiempo, el suelo está constituido por todos los tipos de materia. De esta manera, los suelos son sistemas naturales abiertos y complejos, que se forman en la superficie de la corteza terrestre y cuyas características y propiedades dependen de la acción de agentes climáticos, físico-químicos y biológicos que actúan sobre los materiales geológicos durante un período de tiempo.

En general, las plantas, los animales y los microorganismos edáficos dependen del suelo para sobrevivir. Ellos son sensibles a sus cambios de pH, de salinidad y de textura participando en su transformación, así como en la circulación de elementos en los que se denominan ciclos biogeoquímicos.

De esta manera, el suelo es uno de los principales componentes del ecosistema y no puede ser comprendido como un simple elemento geológico. Por el contrario, es un sistema dinámico y abierto, que intercambia materia y energía con el entorno. Al interpretar al suelo como un sistema se está asumiendo que sus propiedades están interrelacionadas, es decir que si una cambia por algún motivo, muchas otras pueden cambiar a modo de una reacción en cadena (Seneviratne et al., 2010; Verboom y Pate, 2006). El complejo equilibrio dinámico reinante en los suelos y su interacción con el resto de la biósfera es alterado por

diversos motivos, siendo de particular interés y de modo creciente a escala global en los últimos años, la contaminación de los mismos por metales pesados.

Contaminación de suelos superficiales por metales pesados

El suelo es, y ha sido a lo largo de la historia, un importante sumidero de contaminantes emitidos por las actividades humanas; pero al mismo tiempo puede actuar como fuente de contaminantes cuando interactúa con el agua, tanto en escorrentías como en infiltración, con el aire durante la erosión eólica, y con los seres vivos mediante la red trófica (Kabata-Pendias y Pendias, 2001; Mico et al., 2006). Esta relación con ambos roles, fuente y sumidero, entre el suelo y el resto de los compartimientos del ambiente hace que el estudio de la contaminación de los suelos sea de alta prioridad ya que la productividad de los mismos es fundamental para la supervivencia de la humanidad, y la contaminación puede comprometerla (Wienhold et al., 2004). En este contexto se define a la contaminación de los suelos como la presencia de alguna sustancia en una concentración mayor a la natural o “de fondo”, generalmente debido a alguna actividad humana, y que muestra un efecto adverso, en detrimento del ambiente y sus componentes (Knox et al., 1999). También puede definirse la contaminación de los suelos en función de su calidad, entendiendo por “calidad” no sólo el nivel de productividad agropecuaria sino también la calidad y la seguridad de los productos obtenidos, sobre todo los alimenticios (Karlen et al., 1997; Wienhold et al., 2004).

La contaminación de los suelos por metales pesados tiene lugar desde que el hombre fue capaz de procesar minerales y fundir metales, actividad que conlleva principalmente, concentraciones elevadas de éstos en suelos próximos al desarrollo de la actividad. Posteriormente, con los distintos avances tecnológicos surgieron nuevas fuentes de diversos tipos de compuestos muchos de ellos contaminantes, sin embargo la contaminación de suelos por metales pesados sigue siendo una de las más importantes debido a sus elevados tiempos de residencia, puesto que a diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales pesados por ser elementos químicos, no pueden ser degradados. De hecho, está documentado que la industria metalúrgica medieval fue la principal responsable de la contaminación de suelos con plomo a gran escala, la que aún persiste en toda Europa

(Brännvall et al., 1999). A esta característica de persistencia, se suma el hecho de que se acumulan a lo largo de las cadenas tróficas (bioacumulación y biomagnificación), con graves consecuencias sobre el ecosistema y la salud humana (Wu et al., 2010).

Origen y consecuencias de la contaminación de los suelos por metales pesados

La concentración de metales pesados en suelos de origen natural, es el resultado de procesos pedogénicos y esta varía dentro de un amplio rango. No obstante, en las últimas décadas, la concentración de estos elementos de origen natural se ha visto ampliamente superada por el aporte proveniente de actividades humanas, incluso a gran escala (Mico et al., 2006). Algunas de las fuentes de metales pesados de origen antrópico que se han reportado por su importancia en relación a la contaminación de suelos son la agricultura mediante el uso de agroquímicos (pesticidas y fertilizantes) (Cheng, 2003; De Temmerman et al., 2003; Nicholson et al., 2003, 2006), la deposición atmosférica de contaminantes de origen industrial (Nadal et al., 2009; Peltola y Åström, 2003). Las ciudades en sí mismas, dentro de las cuales las emisiones más relevantes son las vehiculares, también son reconocidas como importantes fuentes de metales pesados que se depositan en suelos (Chen et al., 2005; Cheng, 2003; Stein y Toselli, 1996), siendo posible encontrar un gradiente marcado en la disminución de la concentración de estos metales en suelos a medida que aumenta la distancia a las calles, rutas o autopistas (Bäckström et al., 2004; Sutherland et al., 2004).

Dentro de la amplia variedad de fuentes de metales pesados contaminantes de suelos, la más importante en términos de intensidad es la actividad industrial de fundiciones metalíferas (Austin et al., 1993; Ettler et al., 2004; Komárek et al., 2007; Li y Thornton, 2001). Particularmente, las fundiciones de plomo que reciclan baterías ácidas y que utilizan como insumo baterías que han agotado su vida útil. Las mismas son sometidas a un proceso de fundición en hornos para obtener lingotes de plomo. Esta actividad surgió en países europeos y en los Estados Unidos de América a partir de la necesidad de recuperar el plomo evitando a la vez su disposición final como residuo peligroso (Ahmed, 1996). En otros países, como Malasia, el reciclado de baterías ácidas representa la única fuente de plomo

para usos industriales debido a la inexistencia de minas de plomo en el territorio (Phillips y Lim, 1998). El plomo que se obtiene a partir de la actividad minera se denomina “de producción primaria”, mientras que el obtenido por medio del reciclado es “de producción secundaria”. Actualmente, el de producción secundaria alcanza más de la mitad de la producción global total, y proviene principalmente del reciclado de baterías (Ahmed, 1996). Así, en el territorio de los Estados Unidos de América el 92% del plomo proviene de procesos secundarios (Kabata-Pendias y Mukherjee, 2007).

Si bien las industrias de fundición del metal pueden y deben operar en condiciones que produzcan mínimas emisiones de contaminantes al ambiente, numerosos estudios han reportado contaminación por Pb en suelos y extensos daños a la vegetación, a los animales y las personas que viven en zonas cercanas a distintas fundiciones de plomo en el mundo (Cala y Kunimine, 2003; Dahmani-Muller et al., 2000; Mohammed et al., 1996; Ramírez, 2008). Pese a estas evidencias, en América Latina aún sigue siendo común encontrar este tipo de fundiciones en áreas agrícolas o residenciales (Lacasaña et al., 1996; Morales Bonilla y Mauss, 1998; Ramírez, 2008; Sosa et al., 2008).

En relación a su toxicidad, el plomo es uno de los contaminantes ambientales más tóxicos y persistentes que se conocen (Tong et al., 2000). Si bien en muchos países existen rigurosas restricciones a la liberación de este metal al ambiente, la contaminación de suelos por plomo continúa siendo una de las más serias amenazas para el hombre en el mundo entero (Sanders et al., 2009).

La probabilidad de que se alcancen elevados niveles de Pb en suelo depende de factores físicos y químicos de ese suelo, además de la presencia de fuentes de emisión que liberen el metal al ambiente en cualquiera de sus formas (sólida, líquida y gaseosa). La forma química en que se encuentre el metal definirá su movilidad y biodisponibilidad como así también el tiempo de residencia en el suelo. La complejidad de todas las reacciones posibles en un medio naturalmente heterogéneo como es el suelo, plantea la necesidad de disponer de información específica en cada caso de estudio a fin de predecir del modo más certero posible las consecuencias ecológicas de la contaminación del suelo (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Por ejemplo, los cultivos producidos en suelos agrícolas contaminados con plomo pueden presentar un aspecto y rendimiento normal y ser al mismo tiempo tóxicos

para el consumo humano y pese a que es globalmente aceptado que si la concentración de metales pesados en suelo se encuentra dentro de los límites legales los productos agropecuarios son seguros (Kabata-Pendias y Pendias, 2001), se han documentado casos en los que esto no es así, específicamente para el caso de Pb (Salazar et al., 2012). Los efectos de la contaminación de suelos por metales pesados, en especial Pb, Cd y Hg, sobre la calidad de los alimentos que se producen en éstos representa en la actualidad uno de los más preocupantes problemas ambientales a nivel mundial (UE, 2014; FAO-OMS, 2014)

En cuanto a los efectos del plomo sobre los ecosistemas, por presentar éste elevados tiempos de residencia, es frecuente encontrarlo en la vegetación, en aguas superficiales próximas a las fuentes de emisión y aun en animales y microorganismos del suelo. De esta manera ingresa en la red trófica bioacumulándose y biomagnificándose en los distintos organismos (Cao et al., 2003). Por otro lado, la erosión de suelos tanto hídrica como eólica, dispersa partículas del suelo contaminado con el metal, extendiendo el problema a áreas mayores. El plomo contenido en las partículas suspendidas en el aire puede ser incorporado por humanos y animales a través del sistema respiratorio y la ingesta, siendo esta última vía la que lleva a la incorporación del plomo disuelto en agua (Tong et al., 2000).

Cuando existe una fuente de contaminación por Pb, el suelo es el compartimiento ambiental donde más fácilmente se acumula este metal. Desde allí se difunde mediante diferentes procesos ecosistémicos a todos los demás compartimientos. Por ello, es importante señalar que cuando las personas se encuentran expuestas a un medio ambiente contaminado por Pb, por más que este tóxico se concentre principalmente en el suelo, el mismo es fácilmente incorporado en los distintos tejidos. Así, se acumula en huesos reemplazando el calcio presente en los mismos, en glóbulos rojos reemplazando al Fe de la hemoglobina y cuando la exposición es repetida o crónica los efectos se manifiestan como daños en el sistema nervioso, inhibición de la síntesis de hemoglobina y anemia, daño renal, limitaciones en el desarrollo mental y deficiencias cognitivas en la niñez, carcinogénesis, enfermedades metabólicas y disfunción reproductiva (Bushnell y Jaeger, 1986; Kabata-Pendias y Mukherjee, 2007; Landrigan et al., 2002; Lanphear et al., 2000; Morales Bonilla y Mauss, 1998; Tong et al., 2000).

Remediación de suelos contaminados con metales pesados

Los problemas causados por la introducción de metales pesados tóxicos en el ambiente han promovido una gran preocupación en torno a las posibilidades de remediar los suelos contaminados con estos metales. De esta manera, la remediación de suelos contaminados con Pb se ha convertido en un área de investigación emergente, habiéndose propuesto distintas metodologías, las cuales pueden emplearse solas o combinadas a fin de descontaminar suelos (EPA, 1989, 2007).

Históricamente para la remediación de suelos contaminados con metales se utilizaron, y siguen empleándose, técnicas relacionadas con la ingeniería. Las mismas consisten básicamente en excavar, extraer el suelo, tratarlo y disponerlo luego en un sitio seguro. Dentro de estas técnicas se pueden diferenciar variadas metodologías:

- **Excavación con tratamiento ex-situ**

La excavación del suelo contaminado implica obligatoriamente su remoción, en este caso con la finalidad de que sea tratado en otro sitio preparado para ello. Este es un método cuyos resultados son inmediatos, la población deja de estar en contacto con el contaminante y se elimina rápidamente el riesgo de contaminación de aguas subterráneas. Requiere conocer con exactitud los límites del suelo afectado por el contaminante en términos de superficie y también de profundidad. El equipamiento necesario para realizar la excavación es el mismo que se utiliza en las obras de construcción para las tareas de movimiento de suelos, con personal capacitado para estas actividades y aplicando medidas de seguridad propias de los riesgos asociados con la actividad. Frecuentemente se requiere también la construcción de muros de contención que eviten derrumbes y la excavación finaliza cuando los análisis muestran que los márgenes de la perforación presentan la concentración del contaminante prefijada como objetivo del proceso de limpieza (EPA, 2012a).

Una vez que el suelo es extraído debe ser acumulado en pilas envueltas completamente con cubiertas plásticas que eviten el arrastre por viento, el lixiviado por lluvias y cualquier otro tipo de pérdida. Estas pilas se trasladan al sitio de tratamiento donde se aplica algún método físico-químico para eliminar el contaminante. Según cuál sea el contaminante a tratar, pueden existir unidades de procesado móviles que se dirijan al sitio, traten las pilas

en el lugar y vuelvan a rellenar con el mismo material, ya tratado, el espacio excavado. De lo contrario debe procederse a rellenar con materiales traídos de otro sitio. En cualquiera de los dos casos, luego del relleno, debe realizarse una revegetación que prevenga la erosión del nuevo sustrato (Dermont et al., 2008).

En general la duración de este tratamiento está en el orden de algunos días, pero puede verse prolongado si se presentan factores como una gran extensión de la contaminación, presencia de una capa freática poco profunda, suelo muy rocoso, edificaciones cercanas, o sitios muy aislados. Esta metodología de remediación solo se aplica cuando los niveles de un tóxico en suelo son muy elevados, cuando se requieren resultados rápidos o cuando otras alternativas son exageradamente costosas. En términos de costo-beneficios, es rentable cuando las cantidades de suelo a tratar son limitadas (EPA, 2012a; Steele y Pichtel, 1998).

- **Excavación con disposición en vertedero**

Este tratamiento es similar al anterior, y solo se diferencia en los pasos que siguen a la excavación. El suelo extraído es depositado en camiones de transporte y es llevado a su destino final, por ejemplo un enterramiento de residuos peligrosos. En este caso debe procederse al rellenado del espacio excavado con material obtenido de otro sitio y completar el tratamiento con la correspondiente revegetación (EPA, 2012a; Mulligan et al., 2001).

Los requerimientos, costos y beneficios son similares al anterior. El costo de tratamiento es reemplazado por el de disposición final ya que los volúmenes que se tratan ocupan gran parte de los sitios destinados para el enterramiento de residuos peligrosos, si no es que necesitan un predio completo (Dermont et al., 2008).

- **Solidificación y estabilización**

Los términos solidificación y estabilización hacen referencia a un grupo de metodologías que se emplean para tratar suelos contaminados y que se enfocan en la inmovilización o ralentización de la liberación del contaminante al ecosistema. Estos métodos no extraen el contaminante, sino que lo vuelven refractario a su lixiviación, por lo que los niveles en el ambiente circundante están dentro de los parámetros de seguridad (EPA, 2012b; Wang et al., 2001).

En el caso particular de la solidificación, el objetivo es fijar el contaminante en un medio sólido para que permanezca atrapado allí., el que debe ser de un material impermeable. Esta técnica requiere el uso de mezclas cementantes que en general incluyen cemento, asfalto, cenizas, y arcilla. Aun así, los bloques obtenidos deben ser depositados en sitios controlados de disposición final de residuos peligrosos (Dermatas y Meng, 2003).

Por su parte, la estabilización implica reacciones químicas que eviten que el contaminante presente en suelos sea lixiviado o que su escasa liberación suponga una toxicidad mínima para el ambiente. Estas tecnologías pueden ser utilizadas simultáneamente cuando se trata de contaminación por metales pesados y se pretende evitar la exposición de las personas y de la vida silvestre (Dermont et al., 2008; Mulligan et al., 2001). La estabilización también requiere mezclar el suelo contaminado con agentes que produzcan la inmovilización del metal mediante reacciones químicas. Este suelo con el contaminante estabilizado debe ser transportado a un vertedero controlado si las concentraciones del mismo son elevadas. Si sus niveles no son muy altos, el proceso puede llevarse a cabo *in situ*, y la mezcla resultante puede ser usada para rellenar los sitios excavados siempre y cuando se lo aisle lo mejor posible con geomembranas (Mulligan et al., 2001; Wang et al., 2001).

El tiempo requerido para realizar cualquiera de estos procedimientos está en el orden de semanas a meses. Los factores que pueden afectar el plazo requerido para completar el tratamiento son la extensión del área contaminada y su profundidad, la alta densidad del suelo, la presencia de rocas que dificulten el mezclado y la ocurrencia de un clima muy lluvioso (EPA, 2012b).

Dentro de las estrategias de solidificación-estabilización se encuentra, además, la vitrificación. Este procedimiento requiere el uso de energía térmica, y para ello se insertan electrodos en el suelo. La aplicabilidad de esta tecnología requiere que el suelo tenga la capacidad de conducir electricidad, actuando como una resistencia que a medida que es atravesada por la corriente eleva su temperatura hasta llegar al punto de fusión. Un vez que el suelo se funde se interrumpe la corriente y se deja enfriar hasta la solidificación. Durante el proceso pueden liberarse gases tóxicos. Este procedimiento ha sido aplicado exitosamente en casos de contaminación con Pb en áreas extensas pero de poca

profundidad. El material vitrificado resultante puede ser utilizado en construcción si se lleva a cabo una prueba de lixiviado que asegure la inmovilidad del contaminante (Mulligan et al., 2001). La vitrificación también puede ser realizada *ex situ*, mediante hornos de distintos tipos, sin embargo, estos procesos requieren tecnología apropiada y un muy buen control de las emisiones atmosféricas (Jou, 2006; Navarro, 2009).

- **Drenaje ácido: “Flushing” o “Washing”**

La traducción al español de cualquiera de estos términos, “flushing” o “washing” es “lavado”. Ambos procedimientos consisten en lavar el suelo utilizando un fluido de arrastre que, para el caso de contaminación por metales pesados, debe ser de naturaleza ácida. Cuando esta tarea es llevada a cabo *in situ* se la denomina “flushing”, cuando el suelo es excavado y transportado a una planta de tratamiento se denomina “washing” (Dermont y col., 2008).

Para lograr el lavado *in situ* el primer paso es la infiltración del fluido de extracción. La eficiencia de este proceso va a estar definida por la permeabilidad del suelo a tratar ya que en suelos más permeables la probabilidad de éxito es mayor. El fluido de extracción debe estar compuesto mayoritariamente de agua y en menor medida, de algún agente ácido ya sea orgánico o inorgánico. Un compuesto muy utilizado para la extracción de metales es el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), si bien en sí mismo es un contaminante de suelos y de agua. Una vez que el fluido es inyectado al suelo se lo debe movilizar para que atraviese la zona contaminada arrastrando los metales hacia una bomba de extracción. El lixiviado recogido debe ser tratado como residuo peligroso y dependiendo del metal y de sus concentraciones, puede ser reutilizado. La ingeniería de este procedimiento es compleja y bastante costosa. El uso de ácidos o de agentes quelantes no solo remueve los metales contaminantes sino que paralelamente altera irreversiblemente muchas propiedades del suelo, comprometiendo en alguna medida su funcionalidad ecosistémica (Costello, 2003; Mulligan et al., 2001; Wasay et al., 2001).

El lavado *ex situ* es similar pero requiere la previa excavación y traslado del suelo contaminado. Se utilizan reactores o cámaras de lavado, trabajándose con ácidos inorgánicos fuertes, ácidos orgánicos, agentes quelantes como EDTA y NTA (nitriloacetato), o combinaciones de ellos. El suelo tratado puede ser reubicado nuevamente

en su sitio original, aunque como en el caso anterior, sus propiedades se verán afectadas. Para que el proceso sea efectivo el suelo debe presentar porcentajes de arcilla y materia orgánica inferiores al 20% (Dermont y col., 2008; Mulligan y col., 2001).

- **Tratamiento químico**

Los tratamientos químicos aplicables a la remediación de suelos contaminados incluyen procesos de reducción, de oxidación, y de neutralización. Las reacciones reductoras se inducen añadiendo al suelo sustancias como dióxido de azufre, sales con ion sulfito y sulfato de hierro (II). La finalidad es reducir la movilidad del contaminante al pasarlo de un estado oxidado a formas reducidas. Las reacciones de neutralización se aplican cuando se busca ajustar el pH de suelos demasiado ácidos o demasiado básicos siendo esta la causa de una alta movilidad del contaminante que se trate. Las reacciones de oxidación tienen la finalidad de reducir la toxicidad, precipitar o solubilizar los metales e implican el agregado de compuestos tales como permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno, hipoclorito de sodio o gas cloro. Para el caso particular de la contaminación de suelos con Pb, el tratamiento químico más adecuado es el de reducción (Costello, 2003; Mulligan y col., 2001).

Cualquiera de los tratamientos químicos descritos presenta la desventaja de ser no específico y por ello aumentan el riesgo de convertir otros metales, u otras sustancias presentes en el suelo, en especies más tóxicas o móviles.

- **Electrocinética**

Este procedimiento consiste en la aplicación de una corriente eléctrica de baja intensidad entre un cátodo y un ánodo que se encuentran embebidos en el suelo contaminado que debe estar saturado con agua. De esta manera los iones migran hacia el cátodo o hacia el ánodo según el signo de su carga. Este tratamiento se puede realizar *in situ* o en suelos excavados. Permite extraer metales que estén en forma de iones solubles, o unidos al suelo en forma de óxidos, hidróxidos o carbonatos. A diferencia del lavado ácido, los suelos arcillosos pueden ser tratados por este método sin dificultad y si bien este tratamiento es común en suelos contaminados con plomo en Europa, esta tecnología casi no

se emplea en otras partes del mundo (De la Rosa-Pérez et al., 2007; Mulligan et al., 2001; Pazos et al., 2006).

- **Separación física**

Este método se basa en que los metales pesados se adhieren principalmente a las partículas más pequeñas del suelo, y dada esta condición el tratamiento consiste en separar las partículas más finas del suelo de las más grandes. De esta manera el volumen de material contaminado a tratar se reduce en gran medida. Las tecnologías que se aplican incluyen el uso de hidro-ciclones, separación en lecho fluido, métodos gravimétricos y de flotación, entre otros. Este método no representa por si solo un tratamiento completo del suelo, no obstante es cada vez más utilizado como paso previo ya que reduce el costo de las otras fases de remediación (Dermont et al., 2008; Mulligan et al., 2001).

- **Utilización de enmiendas**

Se denominan enmiendas a cualquier tipo de agregado que se mezcla con el suelo con el propósito de diluir el contaminante y de favorecer su inmovilización en función de las propiedades físico-químicas de la mezcla enmienda-suelo. Una de las enmiendas más utilizadas es la materia orgánica en descomposición, en esta las uniones que se forman entre los metales solubles y los componentes de la enmienda son, en general, suficientemente fuertes y evitan que el metal se movilice y sea absorbido por la vegetación (Brown y col., 2005; Clemente y col., 2012). También pueden utilizarse cenizas provenientes de actividades industriales, siempre que no causen un problema mayor. Cuando estas cenizas son alcalinas suelen usarse para controlar el pH del suelo reduciendo la solubilidad del metal. Aún así, en el uso de enmiendas debe considerarse su carácter no permanente ya que va cambiando su composición química, por lo que requieren un seguimiento posterior.

Las metodologías expuestas para la remediación de suelos contaminados con metales pesados presentan el mismo tipo de complicaciones generales: llevan a la pérdida de la funcionalidad del suelo ya que eliminan la actividad biológica del mismo, o alteran sus propiedades fisicoquímicas (Dermont et al., 2008; Ghosh y Singh, 2005), tienen un elevado costo económico, implican un gran consumo de energía e insumos que se incorporan al

ambiente como contaminantes, no contemplan la restauración de los suelos y la mayoría requieren un sitio adicional al de partida (Garbisu Crespo et al., 2007; Rodriguez et al., 2007; Wu et al., 2010). Estas limitaciones son especialmente determinantes cuando los suelos contaminados son de uso agrícola, ya que las modificaciones que estas metodologías introducen en el suelo llevarían a la pérdida de la utilidad del recurso.

En este contexto, una metodología más reciente que desde hace algunos años ha cobrado importancia en el campo de la remediación de suelos contaminados con metales pesados es la fitorremediación (Alvarez y Illman, 2006; Fingerman y Nagabhusanam, 2005; Paz-Ferreiro et al., 2013; Wu et al., 2010). Esta tecnología pertenece al área de la biotecnología, y consiste en la utilización de plantas y microorganismos asociados a éstas con la finalidad de remediar la contaminación del ambiente (suelos, sedimentos, y agua). Según cada caso y cada especie se deben tener en cuenta consideraciones diferentes. El objetivo es aprovechar algún proceso fisiológico o mecánico de las plantas que permita solucionar de alguna manera el problema de la contaminación. Dentro del concepto de fitorremediación se incluyen los procesos de degradación, extracción y estabilización (Bernal et al., 2007; EPA, 2000; Ortega et al., 2008).

La fitodegradación incluye procesos mediante los cuales las plantas presentan la capacidad de romper la molécula del contaminante formando productos inocuos o menos tóxicos que el original; aunque debe destacarse que existen procesos fisiológicos vegetales que pueden generar metabolitos aún más tóxicos, las especies que presenten este comportamiento no deben ser utilizadas en remediación. La fitodegradación de compuestos tóxicos puede ocurrir dentro de la planta cuando ésta incorpora al contaminante, o bien en el suelo mediante procesos que involucran a la raíz, sus exudados y los microorganismos de la rizósfera. Los contaminantes que pueden ser tratados mediante este mecanismo son, en su mayoría, orgánicos (Ortega y col., 2008) y cuando se utilizan las especies apropiadas no se genera ningún tipo de residuo peligroso que requiera ser transportado ni dispuesto de acuerdo a ninguna medida de seguridad.

La fitoextracción está definida por la capacidad que poseen ciertas plantas para tolerar la toxicidad del contaminante y acumularlo en grandes cantidades en tejidos aéreos, los que pueden ser fácilmente cosechados. De esta manera las plantas fitoextractoras se emplean en

numerosos ciclos de siembra y cosecha hasta que la concentración del contaminante en el medio a remediar esté dentro de los límites aceptables. Este método de tratamiento puede llevar décadas dependiendo del contaminante, de sus niveles en el suelo, y de la eficiencia extractora de la especie seleccionada. En general cada especie es útil para un contaminante en particular y el proceso está relacionado con las propiedades del suelo que regulan la disponibilidad del contaminante, con las condiciones climáticas y con los usos y el manejo del suelo en cuestión. Cabe destacar que se trata de una tecnología emergente, aún en etapa de desarrollo, si bien la misma presenta características muy beneficiosas como ser amigable con el ambiente, aceptada socialmente y de muy bajo costo en su implementación. Una vez que las plantas cumplen su ciclo biológico constituyen un residuo peligroso debido a la elevada concentración del contaminante en sus tejidos aéreos. Es por ello que luego de cosechar, la biomasa debe en primera instancia descomponerse de manera natural en condiciones controladas que impidan el escape de lixiviados, y luego debe secarse para reducir volumen y masa al mínimo. Finalmente este residuo debe disponerse en un enterramiento de residuos peligrosos o puede tratarse en hornos de recuperación del metal (Alkorta et al., 2004; EPA, 2000).

La fitoestabilización incluye procesos mediante los cuales las plantas retienen el contaminante en sus raíces impidiendo su movilización. Algunas especies logran unir el contaminante en la parte superficial de las raíces mediante interacción con los exudados, otras lo incorporan y lo alojan en el tejido radicular donde el contaminante permanece largo tiempo, incluso después del ciclo de vida de la planta. Las especies con crecimiento secundario pueden direccionar el contaminante para acumularlo en tejidos duros como la madera donde también permanecerá inmovilizado por mucho tiempo, incluso siglos. Este proceso no genera residuos peligrosos dada la inmovilidad de los contaminantes. De hecho la madera puede utilizarse como materia prima en diversos procesos industriales (Krämer, 2005).

Dentro de las metodologías de fitorremediación, la fitoextracción es la más efectiva para descontaminar suelos, pero al mismo tiempo la más difícil desde el punto de vista técnico. Diversas especies han sido reportadas como excelentes fitoextractoras de metales pesados y para Pb se han citado, entre otras: *Thlaspi* sp., *Zea mays*, *Helianthus annuus*, *Minuartia verna*, *Brassica juncea* (Blaylock et al., 1997; Clemente et al., 2005; Lim et al.,

2004; Mukhopadhyay y Maiti, 2010; Vogel-Mikuš et al., 2005), demostrándose que los mecanismos de fitoextracción pueden ser optimizados si se agregan al suelo ciertos aditivos como el ácido etilen diamino tetraacético (EDTA), el ácido dietilen triamin pentaacético (DTPA) (Bernal et al., 2007; Tian et al., 2011) o el ácido nitrilo triacético (NTA) (Freitas y do Nascimento, 2009). Estas sustancias tienen un efecto quelante del plomo por lo que aumentarían su movilidad en suelos pudiéndolo incorporar las plantas con mayor facilidad. No obstante, luego de estudiar el uso de estos aditivos con mayor profundidad y un enfoque más abarcador, se descubrió que la mayoría de ellos son contaminantes, por lo cual en la última década dejaron de usarse a la vez que comenzaron a profundizarse los estudios sobre la aplicación de microorganismos asociados a las plantas y al suelo (Kidd et al., 2009). Los resultados encontrados en esta última generación de estudios son muy prometedores en relación a la posibilidad del empleo de metodologías de fitorremediación a gran escala.

La fitoextracción de metales pesados de suelos contaminados, dentro de estas tecnologías, presenta limitaciones cuando se trata de suelos con concentraciones extremadamente elevadas de un metal (niveles frecuentemente tóxicos para plantas) o cuando la contaminación es mixta, es decir que varios metales tienen concentraciones elevadas con respecto a las concentraciones de fondo del sistema a tratar.

HIPÓTESIS

La fitorremediación asociada a otras tecnologías de remediación de suelos representa una opción viable para el saneamiento de suelos contaminados con metales pesados en la Provincia de Córdoba, siendo factible utilizar los sitios ya contaminados como banco de especies vegetales tolerantes y apropiadas para ser utilizadas en el proceso.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y aportar conocimientos en el campo de la fitorremediación como estrategia para tratar suelos contaminados por metales pesados en la Provincia de Córdoba mediante el empleo de especies nativas.

1. Capítulo I.

Plomo total y móvil en suelos agrícolas y residenciales alrededor de una fundición recicladora de baterías en Bouwer, Córdoba.

Resumen

Con la finalidad de encontrar un sitio oportuno para el estudio y selección de especies vegetales silvestres y nativas, apropiadas para ser empleadas en la fitorremediación de suelos contaminados con plomo, se estudió el suelo en las inmediaciones de una fundición de baterías clausurada hace algunos años, en Córdoba, Argentina. Con el objetivo de evaluar la contaminación por metales pesados en suelos residenciales y agrícolas próximos al predio, se recolectaron muestras alrededor de las instalaciones abandonadas de la fundición y se determinaron las concentraciones en las fracciones pseudototales y extraíbles con HCl 0,5M de Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn mediante espectrofotometría de absorción atómica (AAS). Los resultados encontrados para Pb mostraron elevadas concentraciones del metal fuertemente asociadas con la fundición, e influenciadas por la distancia a la misma, las concentraciones de Cu y Ni estuvieron ligeramente asociadas, mientras que los niveles de Co, Fe, Mn y Zn no presentaron dependencia de la fuente de emisión de plomo, detectándose una posible fuente de Co en dirección SE en el área de estudio.

La concentración media de plomo pseudototal superó los límites establecidos por la legislación para todos los usos del suelo (agrícola, residencial e industrial). Las concentraciones de Pb extraíble con HCl 0,5M también fueron elevadas, con valores muy próximos a los encontrados para la fracción pseudototal. Estos resultados implican que prácticamente todo el Pb existente en los suelos del área de estudio está en una forma química que puede ser movilizada, y por ende, biodisponible. Este resultado es de importancia ambiental en lo relativo al manejo y gestión de suelos contaminados por metales pesados, ya que la contaminación por Pb de los suelos es generalmente considerada como estable y atribuible al metal asociado con la fracción pseudototal. En una primera etapa, estos resultados constituyeron un fuerte indicio de que el contaminante podía estar disponible para ser incorporado tanto en la vegetación silvestre como en los cultivos que crecen en el área. Los primeros relevamientos indicaron que el sitio seleccionado presentaba condiciones óptimas a fin de realizar un sondeo de especies tolerantes al plomo y posiblemente acumuladoras de este metal. De acuerdo a las guías internacionales de calidad del suelo para la salud ambiental y a la normativa nacional e internacional que fija

niveles máximos de plomo en suelos según los usos, la población humana y la comunidad de vida silvestre en la localidad de Bouwer está expuesta a los efectos tóxicos del Pb.

1.1. Introducción

La contaminación de los suelos por metales pesados es considerada uno de los problemas ambientales más serios en la actualidad dada su persistencia y toxicidad (Adriano et al., 2004). Las condiciones adversas generadas por esta situación pueden mantenerse vigentes incluso mucho tiempo después de retirar la fuente de contaminación. La contaminación de los suelos en general, tiene un gran impacto debido a que la humanidad no es sostenible sin suelos en buenas condiciones (Garbisu Crespo et al., 2007; Rodriguez et al., 2007).

El suelo se comporta como un sumidero de metales pesados provenientes de la deposición atmosférica de partículas emitidas por el tránsito vehicular (Hernandez et al., 2003), actividades industriales (Al-Khashman y Shawabkeh, 2006; Bermudez et al., 2010b; Fabietti et al., 2009), como por su presencia en productos fertilizantes y agroquímicos o por el uso de enmiendas que se emplean en prácticas agrícolas (Fabietti et al., 2009; Mico et al., 2006), por la disposición de residuos industriales (Ettler et al., 2004), o por el vertido de efluentes (Kumar et al., 2007), entre otras. Esto puede resultar en concentraciones de metales pesados por encima de sus valores de fondo y consideradas, en algunos casos, indicadoras de contaminación, que producen cambios negativos en las propiedades del suelo. Pese a los numerosos reportes sobre la contaminación del suelo alrededor de fundiciones secundarias de plomo y su consecuente daño, extensivo a la vegetación, animales y personas (Cala y Kunimine, 2003; Dahmani-Muller et al., 2000), en América Latina es usual encontrar este tipo de industrias dentro de áreas residenciales y agrícolas (Lacasaña et al., 1996; Morales Bonilla y Mauss, 1998; Sosa et al., 2008).

Las principales vías de entrada de los metales a las plantas son el aire, el agua y el suelo, siendo las plantas un punto de conexión importante entre la parte abiótica y biótica del ecosistema en la transferencia de metales (Hamilton, 1995). Los principales riesgos ambientales en la transferencia de metales pesados desde el suelo a las plantas son el ingreso de los metales en la cadena trófica, la pérdida de cobertura vegetal o pérdida de la

productividad de cultivos por su fitotoxicidad, y la absorción de metales por plantas tolerantes que pueden producir efectos tóxicos en la flora, en la fauna y en humanos (Kabata-Pendias, 2004). Los metales con mayor peligrosidad, por su toxicidad para los seres humanos son Cd, Hg y Pb (Chojnacka *et al.*, 2005). Estos pueden ser transferidos a los cultivos desde el suelo, ya que éste es un componente clave en la regulación de la dinámica de dichos contaminantes. Este hecho, muchas veces olvidado, hace que sea importante conocer la concentración y la dinámica de los metales pesados en los suelos para evaluar si sus concentraciones son, o no, adecuadas para la agricultura (Condrón *et al.*, 2000; Andrades *et al.*, 2000; Arshad y Martin, 2002). Así, preservando la calidad del suelo puede garantizarse la calidad y seguridad de los cultivos. Los efectos negativos producidos por los metales pesados en las diferentes partes de los agroecosistemas (suelos, cultivos y agua, así como en los seres humanos) despertó el interés de muchos investigadores desde hace algunas décadas. También la sociedad en general, y los gobiernos, han tomado conciencia de este problema ambiental, y desde la década de los 90 se han adoptado, a nivel internacional, políticas para garantizar una mayor protección de los suelos y un desarrollo sostenible.

El contenido total de los metales en suelos proporciona una información incompleta sobre la peligrosidad de la contaminación de éstos por metales pesados. Por lo tanto, es necesario conocer qué formas químicas de los metales y los niveles en los que son fitodisponibles (Ross y Kaye, 1994). Habitualmente las fracciones biodisponibles de metales se determinan mediante extracciones que utilizan diferentes compuestos químicos, como son el EDTA (ácido etileno diamino tetracético), el ácido dietilentriamino pentaacético (DTPA), o soluciones salinas, como son las de CaCl_2 (Rauret, 1998). Sin embargo, aunque se acercan más a la realidad, muchas de las extracciones sobreestiman la biodisponibilidad de los metales que pueden ser absorbidos por las plantas (Turner, 1994) y, a pesar de las múltiples investigaciones realizadas, todavía no se ha encontrado un método que realice predicciones exactas sobre la disponibilidad de los metales que pueden ser incorporados por los cultivos (Kabata-Pendias, 2004).

El comportamiento de las plantas frente a los metales no es uniforme. Las especies vegetales, e incluso las variedades, difieren entre sí en su capacidad para absorber metales, acumularlos y tolerarlos (Alloway y Jackson, 1991; Turner, 1994; Angelova *et al.*, 2004).

Los mecanismos para tolerar mayores contenidos de metales son diversos. Así, algunas especies son capaces de unir los metales a las paredes celulares, introducirlos en vacuolas o complejarlos con ácidos orgánicos. Pero también, pueden presentar adaptaciones fisiológicas que les permiten realizar sus funciones en presencia de cantidades elevadas de metales pesados (Thurman, 1981). En función de su respuesta a los metales pesados, las plantas se han clasificado en tres tipos: resistentes o exclusoras, tolerantes o indicadoras, y acumuladoras (Ross y Kaye, 1994). Las exclusoras restringen la entrada o la translocación de metales tóxicos. Esto les permite vivir en ambientes con elevadas concentraciones de metales (Barceló y Poschenrieder, 1992). Las tolerantes o indicadoras reflejan el incremento de metal producido en el entorno. Por último, las acumuladoras incorporan activamente metales en sus tejidos. La diferenciada capacidad de acumular metales pesados por las especies vegetales ha hecho que se desarrolle una importante línea de investigación, denominada fitorremediación. La aplicación de esta técnica a la descontaminación de suelos es de gran importancia en suelos agrícolas, ya que aquellas plantas con mayor capacidad para acumular metales, las hiperacumuladoras, pueden ser utilizadas como fitorremediadoras (Anderson et al., 2001).

La contaminación de los suelos por metales pesados es tradicionalmente evaluada en términos de concentraciones totales o pseudototales de cada metal, no obstante está demostrado que el peligro que los metales tóxicos representan para los seres vivos está determinado en mayor medida por formas químicas más disponibles para los seres vivos, que por la concentración total (Lavado et al., 2007; Sutherland et al., 2004). Es por ello que se han propuesto diversos reactivos para estimar la disponibilidad de los metales mediante distintos métodos de extracción. Dentro de los métodos reportados en bibliografía, el ácido clorhídrico diluido (0,5 M) es una opción de bajo costo y ampliamente usada para extraer la fase no residual de los metales de medios sólidos (Sutherland, 2002). En relación a esto, el uso de HCl 0,5 M (Agemian y Chau, 1977) satisface los requerimientos mínimos de la extracción de metales que forman parte de la fracción intercambiable, con una alteración mínima de la matriz de silicatos (Andrews y Sutherland, 2004; Sutherland, 2002; Sutherland et al., 2004; Sutherland y Tolosa, 2001). Esta extracción puede ser interpretada como la fracción movilizable de un metal en suelo debido a que el HCl diluido libera los

metales asociados a carbonatos junto con aquellos asociados a óxidos de Fe y Mn (Andrews y Sutherland, 2004).

Los metales depositados en el suelo pueden transferirse a otros compartimentos del ecosistema, como por ejemplo la vegetación silvestre, la fauna, el agua subterránea y los cultivos; esto puede afectar directa o indirectamente a la salud humana (Cala y Kunimine, 2003; Kabata-Pendias y Mukherjee, 2007). Es por ello que el estudio de la movilidad de los metales pesados en suelos agrícolas y su relación con los factores fisicoquímicos es de gran importancia en los efectos de éstos sobre los ecosistemas y la salud humana. Diversos estudios han demostrado que la solubilidad de los metales en el suelo está fuertemente influida por el pH y el contenido de materia orgánica y que también puede verse reflejada en la conductividad eléctrica de la solución del suelo (Zeng et al., 2011, Bermudez et al., 2010^a; Sutherland, 2002, Sauvé et al., 2000). No obstante la relación entre estas variables es diferente cuando se trata de distintos tipos de suelo en presencia de distintos elementos contaminantes o especies del mismo, biotas dominantes y climas reinantes (Zeng et al., 2011, Sauvé et al., 2000). Por lo tanto es de gran interés estudiar los suelos agrícolas y residenciales cercanos a actividades altamente contaminantes de suelos cuando no se realizan en condiciones adecuadas, como son las fundiciones de metales, y para valorar la disponibilidad del contaminante de interés y la situación de riesgo es menester determinar la relación entre las variables expuestas previamente. En este caso particular, fue de interés para este estudio estudiar la concentración de metales pesados en suelos próximos a una fundición secundaria de plomo en la Provincia de Córdoba. Los objetivos de trabajo fueron: a) analizar la distribución de Pb y otros metales en los suelos aledaños a una fundición recicladora de baterías ácidas, evaluando las concentraciones pseudototales y extraíbles con HCl 0,5 M; b) evaluar la relación de dichas concentraciones con la distancia a la fundición; c) estudiar la relación entre la movilidad de los metales y el pH, conductividad eléctrica y el contenido de materia orgánica de los suelos.

Debido a que la mayor parte de los metales emitidos al medioambiente por las industrias se libera por chimenea y los mismos pueden ser transportados por el viento, la distribución espacial de estos contaminantes en el suelo estará influida por este factor. Esto hace esperable que a una misma distancia de la industria, se encontrará mayor concentración de metales pesados en los sitios que se encuentran a favor de los vientos

predominantes. No obstante, la disposición de residuos sólidos sin tratamiento previo y directa sobre el suelo, ocurrida durante el funcionamiento de la fundición en Bouwer, puede alterar ligeramente este patrón esperado.

1.2. Materiales y Métodos

1.2.1. Área de estudio

El área de estudio se encuentra localizada en Bouwer, a 18 km al sur de la ciudad de Córdoba Capital, Argentina (Figura 1.2.). En este lugar operó una fundición recicladora de Pb a partir de baterías ácidas agotadas, desde el año 1984 hasta el año 2005. El funcionamiento de la misma no contaba con filtro en chimenea para el control de las emisiones a la atmósfera ni con una gestión apropiada en la disposición de los residuos sólidos que contenían plomo, un residuo peligroso. Las emisiones atmosféricas eran evacuadas a través de una chimenea improvisada, sin filtros para la retención de gases y material particulado. Las escorias (residuos sólidos del horno de fundición) eran depositadas sobre el suelo del predio, pero también eran distribuidas entre los vecinos de Bouwer para ser usada como material de relleno durante la construcción de viviendas y mantenimiento de calles públicas. Los empleados de la fundición y los vecinos más cercanos sufrieron enfermedades directamente relacionadas con la exposición a plomo. Consecuentemente, las autoridades provinciales realizaron un control de emisiones hallando 35 veces el valor máximo permitido; este funcionamiento irregular llevó a la clausura definitiva de la fundición en el año 2005. Debe señalarse que este predio no ha sido remediado hasta el momento, de hecho no se midieron hasta el momento los niveles de metales pesados en suelos ni se hicieron estudios sobre la movilidad del metal a fin de evaluar su posible impacto sobre el ecosistema y la salud de la población de Bower. Estos suelos a pesar de ser próximos al predio donde operaba la fundición, tienen uso agrícola, principalmente con producción de soja, y uso residencial.

El área de estudio comprendió una superficie de 3 km² abarcando suelos con distintos usos, próximos a la fundición y alejados de esta dentro de un radio de 1 km en las cuatro

direcciones cardinales, con la finalidad de evaluar la dispersión de plomo en el área y el alcance de la posible contaminación.

1.2.2. Diseño de muestreo

Dado que los vientos principales que dominan la zona son del Norte, y del Nor-Noreste, y contemplando la ocurrencia frecuente de días con fuertes vientos de dirección Sur, se diseñó un muestreo en transectas en dirección de los vientos predominantes y perpendiculares a éstos en relación a la ubicación de la fundición. De este modo, las transectas en dirección de los vientos fueron la “Transecta Sur” (TS) y la “Transecta Norte” (TN); y las transectas perpendiculares a los vientos fueron la “Transecta Este” (TE) y la “Transecta Oeste” (TO). Todas tuvieron su punto de origen común, situándose éste en la propia fundición (31,56° S; 64,19°O). En cada transecta se seleccionaron de manera sistemática, sitios de muestreo a fin de evaluar las condiciones del suelo en relación a la distancia de éstos a la fundición (el primer punto de cada transecta se situó a 50 m de la fundición, los siguientes puntos se ubicaron cada 100 m hasta los 500 m desde la fundición y a partir de allí cada 250 m). Se completó un total de 29 sitios de muestreo entre las cuatro transectas. También se seleccionaron dos sitios control por fuera de las transectas, uno denominado “Control Interno” (CIn), ubicado a 5,6 km desde la fundición y dentro de la localidad de Bouwer; y otro denominado “Control Externo” (CEx), a 38 km de la fundición, en la localidad de Los Molinos. Ambos controles están ubicados en la misma pedanía que la localidad de Bouwer, presentando suelos del mismo tipo: MNen-4 el cual pertenece al orden “molisol”, suborden “ustol”; gran grupo “haplustol”; y subgrupo “MNen haplustol éntico” (Damiano y Taboada, 2000; Gorgas y Tassile, 2003; Sanabria y Argüello, 2011).

Para evaluar el efecto de los residuos sólidos (escorias) de la industria se eligieron otros dos sitios alejados de la fundición en los que se depositaron durante el tiempo en que funcionó la fundición una cantidad importante de escorias. Estos dos puntos de muestreo correspondieron uno a la pila de escorias (BE) y el otro fue ubicado a una distancia de 10 m de la misma (JE). De este modo el número total de puntos de muestreo fue de 33 (Figura

1.2.), recogiendo en cada uno de ellos tres muestras independientes de suelo (triplicado real en cada uno).

1.2.3. Procedimiento de muestreo

En cada sitio de muestreo se removieron manualmente todos los elementos extraños o ajenos al suelo y luego se recolectaron muestras de suelo superficial hasta una profundidad de 10 cm utilizando una pala de acero inoxidable. En cada punto se colectaron tres muestras independientes compuestas, constituida cada una por tres submuestras. Para ello fue necesario recolectar 9 submuestras espaciadas por 2,5 m entre sí. En cada submuestra se tomaron 150 g de suelo y se mezclaron reuniendo: a) las tres submuestras más cercanas a la fundición, b) las tres más lejanas, y c) las tres intermedias (Figura 1.1.). Las muestras compuestas se mezclaron y tamizaron para lograr homogeneidad. Este diseño permitió testear la homogeneidad de cada sitio de muestreo. Los suelos recolectados fueron trasladados en bolsas plásticas y secados en estufa a 40 °C por 24 horas. Todas las muestras fueron tamizadas con un tamiz de 2 mm y almacenadas en oscuridad hasta su procesamiento (Bäckström et al., 2004).

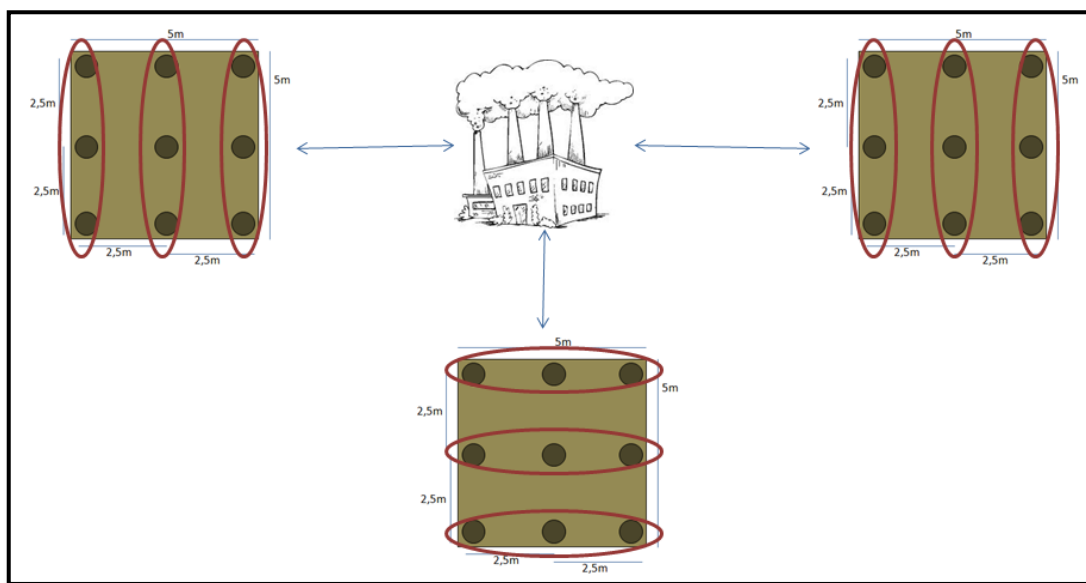


Figura 1.1. Disposición de las submuestras dentro de las cuadratas en las distintas transecta.

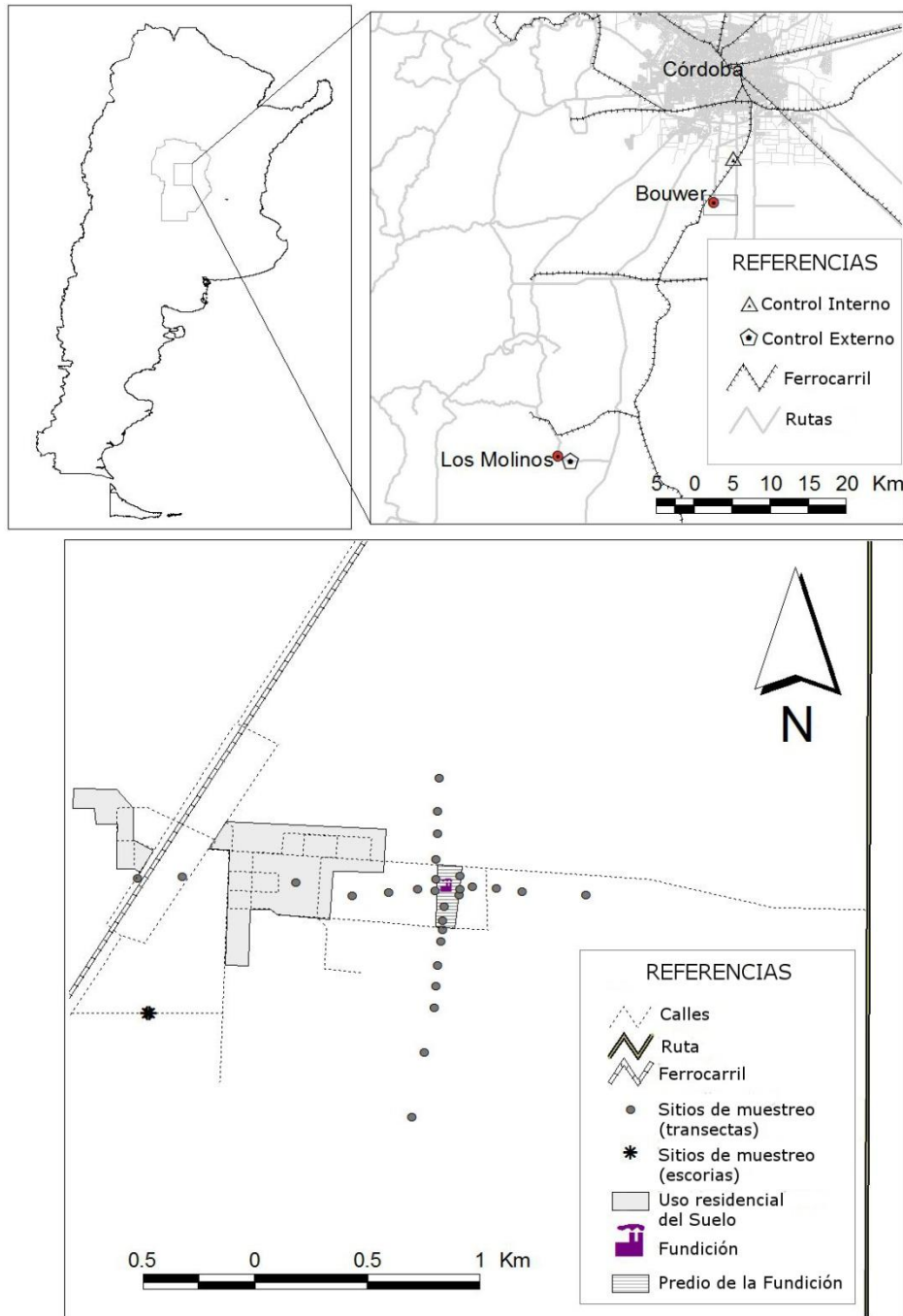


Figura 1.2. Área de muestreo de suelos superficiales en Córdoba (Argentina) en los alrededores de una fundición de plomo ubicada en Bouwer. Las transectas se determinaron de acuerdo a los vientos predominantes.

1.2.4. Análisis Fisicoquímicos

1.2.4.1. Conductividad eléctrica, pH y porcentaje de materia orgánica

Con la finalidad de determinar el pH y la conductividad eléctrica (CE) de los suelos superficiales recolectados se realizó una extracción preparando una suspensión suelo:agua en proporción 1:5 P/V por triplicado (Bäckström et al., 2004). La misma se agitó por 30 minutos a temperatura ambiente y se dejó descansar por 24 horas. El pH y la CE se midieron en el sobrenadante utilizando un pH metro TPX II (Altronix, Estados Unidos de América) y un conductímetro CON 500 Series (Oakton, Singapur).

Para determinar el porcentaje de materia orgánica (%MO) en los suelos se empleó la metodología desarrollada por Peltola and Åström (2003), la misma consiste en evaluar la diferencia de peso antes y después de una combustión del suelo en mufla a 500 °C por 4 horas.

1.2.4.2. Metales pesados extraíbles con HCl 0,5 M

Con el objetivo de analizar la concentración de los metales pesados intercambiables en los suelos superficiales, se realizó una extracción con ácido clorhídrico a una concentración 0,5 M. Esta técnica ha sido utilizada exitosamente en otras investigaciones para evaluar las concentraciones de metales pesados no residuales en sedimentos de cursos de agua y en suelos (Bermudez et al., 2010^a; Sutherland, 2002; Sutherland et al., 2004; Sutherland y Tolosa, 2001). La extracción con HCl 0,5M permite obtener la fracción intercambiable de metales pesados asociados a carbonatos así como los que se encuentran móviles, como parte del suelo. Por otra parte, es posible que el HCl a esta concentración libere parte de la fracción de metales asociados a óxidos de Fe y Mn, pero de ninguna manera tiene la capacidad de liberar la fracción residual asociada a silicatos (Sutherland y Tolosa, 2001).

Para emplear esta técnica fue necesario tamizar nuevamente las muestras de suelo (previamente tamizadas a 2 mm), en esta ocasión a 63 µm con una malla de acero inoxidable y sin moler para evitar transformar las fracciones granulométricas durante el proceso (Sutherland et al., 2004). Luego, la extracción propiamente dicha, se llevó a cabo mezclando 7 g de suelo (peso seco) con 25 mL de HCl 0,5M seguido por agitación a

temperatura ambiente por 30 minutos. Luego de 24 horas, la solución fue filtrada con papel de filtro de 2 μm (Munktell, Alemania) y analizada utilizando un espectofotómetro de absorción atómica de llama (FAAS) Perkin-Elmer AA3110 para determinar las concentraciones de Co_{HCL} , Cu_{HCL} , Fe_{HCL} , Ni_{HCL} , Mn_{HCL} , Pb_{HCL} , Zn_{HCL} y Cd_{HC} (Sutherland, 2002).

1.2.4.3. Metales pesados pseudototales

Con el objetivo de analizar las concentraciones de metales pesados correspondientes a la fracción de pseudo totales en suelos superficiales, se llevó a cabo una extracción con ácido clorhídrico y ácido nítrico concentrados 3:1 (V/V) (aqua regia) (Ketterer et al., 2001). Esta técnica ha sido utilizada con éxito en numerosos trabajos para evaluar las concentraciones de metales en suelos, sedimentos y otras matrices sólidas (Fachinelli et al., 2001; Dragović et al., 2008; Micó et al., 2006; Rodríguez et al., 2008). Se tomaron como base los procedimientos sugeridos por EPA (método 3051A), con modificaciones, las que se debieron, principalmente, a la falta de un horno de microondas para digerir las muestras. Para ello, se tomaron 5 g de suelo (peso seco), previamente tamizados a 63 μm con malla de acero inoxidable, y se los llevó a mufla a 450 °C por 4 horas (Peltola y Åström, 2003). Luego se realizó la extracción de metales de las cenizas empleando 10 mL de HCl/HNO_3 3:1 (V/V) (Franco-Uría et al., 2009). Se agitó la suspensión durante 30 minutos y luego de 24 horas se filtró con papel de filtro de 2 μm (Munktell, Alemania) analizando la concentración de Co, Cu, Fe, Ni, Mn, Pb, Zn y Cd en el sobrenadante utilizando un espectofotómetro de absorción atómica de llama Perkin-Elmer AA3110.

Para asegurar la calidad de las determinaciones analíticas se prepararon muestras “blanco” y de material certificado (CRM GBW07405 Soil-NRCCRM, China) de la misma manera en que se procesaron todas las muestras de suelos. Los porcentajes de recuperación para el material certificado fueron de $87 \pm 3 \%$ para Pb, $90 \pm 1 \%$ para Cu, $89 \pm 3 \%$ para Co, $93 \pm 2 \%$ para Ni, $94 \pm 6 \%$ para Fe, $90 \pm 3 \%$ para Zn, y $89 \pm 4 \%$ para Mn, estos son porcentajes promedio y sus desvíos estándar expresados con respecto al valor declarado y teniendo en cuenta todas las determinaciones realizadas en la fracción pseudototal de suelo a lo largo de la tesis completa. Los blancos siempre arrojaron valores por debajo del límite

de detección del equipo. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado (réplicas analíticas) y los coeficientes de variación entre los mismos nunca superaron el 10%.

1.2.5. Métodos estadísticos

Se empleó el test de Shapiro-Wilks para evaluar la distribución normal de los datos. Las concentraciones de los metales que no presentaron distribución normal fueron transformadas logarítmicamente antes de realizar los análisis estadísticos paramétricos. Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) para determinar el efecto de los tratamientos sobre las concentraciones de los elementos con categorías arbitrarias. En un primer ANOVA los tratamientos fueron los sitios dentro de cada transecta, y en un segundo ANOVA los tratamientos fueron las transectas. Este mismo análisis se utilizó para comparar las tres muestras compuestas provenientes de cada sitio de muestreo entre si y determinar la homogeneidad de los sitios.

Se realizaron regresiones curvas para elaborar modelos predictivos de la concentración de los metales en los suelos superficiales en función de la distancia a la fuente. Cuando la regresión simple no fue suficiente para predecir la concentración de algún elemento se utilizaron regresiones lineares múltiples incorporando variables como porcentaje de materia orgánica y el pH del suelo. También se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman para identificar posibles relaciones entre el contenido de Pb y otros metales medidos en el suelo.

1.3. Resultados y Discusión

1.3.1. Estadística descriptiva

Los resultados correspondientes a la estadística descriptiva de las concentraciones elementales y las propiedades fisicoquímicas del suelo se presentan en la Tabla 1.1. La misma representa el conjunto completo de datos obtenidos para todos los sitios con el objetivo de reflejar los gradientes de contaminación. La concentración de Pb en los suelos superficiales de cada sitio de muestreo y los ANOVAs para cada transecta se muestran en

la Tabla 1.2. De acuerdo con la legislación Argentina y las pautas canadienses para la calidad del suelo (SQG, Tabla 1.3.) (CCME, 1991, 2007), las concentraciones pseudototales de Cu, Co, Ni, y Zn en el área de estudio se encontraron dentro de los límites establecidos para los usos agrícola, residencial e industrial. También es importante destacar que estos valores fueron similares a los reportados en un estudio previo de suelos en la provincia de Córdoba (Bermudez et al., 2010b), pero superior a los valores encontrados en los sitios control (Tabla 1.1.).

La concentración de Pb pseudototal en los suelos estudiados superó los límites fijados por la legislación nacional e internacional para los usos de suelo agrícola, residencial e industrial tanto en los sitios como en las transectas: 1 y 2 (TS); 10 (TO); 18 (TN); 23 y 25 (TE). Estos valores representan un riesgo para la salud del medio ambiente de acuerdo con las directrices nacionales (CCME, 2007) (Tabla 1.3.).

Al comparar los resultados con los provenientes de otros estudios sobre concentración de Pb en suelos superficiales alrededor de fundiciones de baterías de plomo en los Estados Unidos de América, la concentración de Pb pseudototal en suelos superficiales de Bower no fue tan elevada como las encontradas por Elliott y Brown (1989) quienes informan una concentración de 21% (P/P) y Austin et al. (1993) que encontraron concentraciones de 30.000 mg kg⁻¹. No obstante existen estudios que informan resultados similares a los aquí encontrados, como por ejemplo Kim et al. (2003), quienes reportaron 13.260 mg kg⁻¹; Eckel et al. (2002), quienes estudiaron los suelos superficiales alrededor de 10 hornos de fundición de baterías diferentes, encontraron niveles entre 306 y 2550 mg kg⁻¹ PS. Por otra parte, en España, Cala y Kunimine (2003) estudiaron el suelo alrededor de una fundición de plomo recicladora de baterías reportando un valor de 5.900 mg kg⁻¹ PS, menor al encontrado en Bouwer, Córdoba.

En cuanto a los metales pesados extraíbles con HCl 0,5 M, las distintas legislaciones no cuentan con estándares normativos fijados para suelos; por este motivo los resultados encontrados no han sido comparados con valores máximos permitidos. Sin embargo, en el presente estudio, las concentraciones Cu_{HCl}, Mn_{HCl}, Ni_{HCl} y Zn_{HCl} fueron inferiores a los resultados hallados por Sutherland y Tolosa (2001), quienes estudiaron los efectos de la contaminación de origen vial sobre las concentraciones de metales pesados en suelo

superficial mediante una digestión parcial con HCl 0,5 M en Hawai. Cabe destacar que las concentraciones de Pb_{HCl} y Fe_{HCl} encontradas en Bouwer fueron mayores a las informadas por dichos autores.

Tabla 1.1. Estadística descriptiva de las concentraciones pseudototales y extraíbles en HCl 0,5 M de Pb, Cu, Co, Ni, Fe, Zn, Mn ($mg\ kg^{-1}$ PS), de porcentaje de materia orgánica (%MO), conductividad eléctrica (CE expresada en $\mu s.cm^{-1}$) y pH en suelos de los alrededores de una planta de fundición de baterías en Bower, Córdoba, Argentina.

	Mínima	Máxima	Media	Desvío Estándar	Control interno	Control externo
Pb	6,9	13023	712	2215	9,9	10,0
Pb_{HCl}	7,8	3496	394	755	9,1	4,1
Cu	1,40	51,2	8,99	7,27	3,7	13,8
Cu_{HCl}	1,60	39,7	4,37	5,31	2,9	2,4
Co	3,10	25,1	12,3	5,06	7,6	6,8
Co_{HCl}	0,80	4,30	2,95	0,57	4	4,4
Ni	2,00	8,60	4,57	1,44	9,2	6,7
Ni_{HCl}	1,70	6,20	2,57	0,69	3,1	1,8
Fe	2071	21991	10288	3946	2392	14146
Fe_{HCl}	223	2080	561	248	284	401
Zn	14,7	167	33,5	23,4	23,9	40,6
Zn_{HCl}	2,8	74,3	8,54	10,6	8,8	3,5
Mn	78,6	736	437	145	242	636
Mn_{HCl}	64,1	364	267	51,3	329	180
pH	4,25	7,13	6,47	0,53	6,62	6,82
%MO	4,07	16,3	5,79	1,85	5,77	3,09
CE	37,20	730	133	104	215	73,8

Los elementos sin subíndice indican concentración en la fracción pseudototal. El subíndice HCl indica metales pesados extraídos con HCl 0,5 M. Para los controles interno y externo, los datos presentados corresponden a los valores medios.

Los resultados encontrados para suelos de Bouwer muestran elevadas concentraciones de Pb psudototal y extraíble. Un dato llamativo es que las concentraciones de Pb_{HCl} fueron similares a las de Pb pseudototal en la mayoría de los sitios. Este es un hallazgo importante ya que ésta representa la fracción movilizable, es decir el Pb que puede estar disponible para determinados seres vivos (Cala y Kunimine, 2003; Kabata-Pendias y Mukherjee, 2007). Desde el aspecto ambiental, esto supone que, en promedio, un 93% del Pb total contenido en los suelos de Bouwer es extraíble con HCl 0,5M, porcentaje muy superior a los valores reportados en otros estudios que utilizaron la misma técnica de extracción,

encontrando porcentajes de extracción comprendidos entre el 35% y el 80% (Isoyama y Wada, 2007; Moutsatsou et al., 2006; Reed et al., 1996).

Tabla 1.2. Concentraciones pseudototal y extraíble en HCl 0,5 M de Pb (mg kg⁻¹PS ± DE) medidas en suelos superficiales de los alrededores de una fundición de baterías en Bower, Córdoba, Argentina, y análisis de la varianza (ANOVA) en cada transecta.

Sitio de muestreo	Distancia (m)	Pb (media ± DE)	Pb Diferencias	Pb _{HCl} (media ± DE)	Pb _{HCl} Diferencias
Transecta Sur (TS)					
1	80	11936±1144	A	3000±591	a
2	140	2644±622	B	2376±301	b
3	180	270,3±16,8	C	289,6±40,3	c
4	230	114,2±8,3	C	167,5±12,0	d
5	340	67,4±11,5	D	100,4±16,9	d
6	430	51,8±6,1	D	55,1±9,5	e
7	530	41,4±4	D	41,1±3,8	e
8	730	27,6±2,8	E	25,2±3,7	f
9	1020	20,3±3,5	E	16,4±1,6	f
ANOVA		p<0,001		p<0,001	
Transecta Oeste (TO)					
10	40	1230±261	A	1591±295	a
11	120	149,5±12,4	B	170,6±9,4	b
12	220	29,9±5,1	C	27,1±5,8	c
13	360	20,2±1,6	C	15,7±0,9	d
14	560	20,1±1,9	C	13,6±1,6	d
15	580	17,5±4,5	C	19,1±3,0	d
16	990	26,7±2,3	C	20,2±3,3	d
17	1230	9,7±2,3	D	8,8±1,2	e
ANOVA		p<0,001		p<0,001	
Transecta Norte (TN)					
18	50	1439±130	A	1550±196	c
19	140	295,5±35,5	B	280,8±34,8	b
20	250	266,4±8,1	B	246,9±11,3	bc
21	350	115,7±1,4	C	102,3±1,3	cd
22	490	39,1±2,6	C	31,1±1,6	d
ANOVA		p<0,001		p<0,001	

Pb sin subíndice muestra la concentración del metal en la fracción pseudototal. El subíndice HCl indica la concentración de plomo en suelos correspondiente a la fracción extraíble con HCl 0,5 M. Para los controles interno y externo, los datos presentados corresponden a los valores de media aritmética. Se destacan en negrita los valores que superan el límite legal para el uso agrícola de los suelos.

Tabla 1.2. (Continuación). Concentraciones pseudototal y extraíble en HCl 0,5 M de Pb (mg kg⁻¹PS ± DE) medidas en suelos superficiales de los alrededores de una fundición de baterías en Bower, Córdoba, Argentina, y análisis de la varianza (ANOVA) en cada transecta.

Sitio de muestreo	Distancia (m)	Pb (media ± DE)	Pb Diferencias	Pb _{HCl} (media ± DE)	Pb _{HCl} Diferencias
Transecta Este (TE)					
23	62	1050±307	A	640,7±183	a
24	120	235,9±27,1	BC	193,3±8,1	c
25	56	348,8±78,1	B	275,0±60,3	b
26	110	89,7±8,4	C	87,4±7,6	d
27	200	40,2±2,1	D	37,1±0,8	e
28	300	23,5±1,1	D	18,2±2,0	f
29	540	21,9±1,0	D	16,9±2,2	f
ANOVA		p<0,001		p<0,001	
Controles					
“Control interno”	5630	9,9±1,7		9,1±0,9	a
“Control externo”	38060	10,00±0,01		4,1±0,4	b
ANOVA		ns		p<0,01	

Pb sin subíndice muestra la concentración del metal en la fracción pseudototal. El subíndice HCl indica la concentración de plomo en suelos correspondiente a la fracción extraíble con HCl 0,5 M. Para los controles interno y externo, los datos presentados corresponden a los valores de media aritmética. ns: no significativo. Se destacan en negrita los valores que superan el límite legal para el uso agrícola de los suelos.

Estos resultados llevan a analizar críticamente la legislación que regula la concentración de metales pesados en los suelos (Ley Nacional N°24051, República Argentina), ya que en todos los casos se refiere a valores máximos permitidos en suelos según los usos, para la fracción pseudototal. En el caso particular de Pb los niveles máximos permitidos se refieren a la concentración total del metal y no indican su posibilidad de migración o extracción. Este estudio demuestra que la mala gestión de las industrias dedicadas al reciclado de baterías ácidas pueden provocar la contaminación de los suelos próximos a estas, principalmente con Pb en una forma química movilizable. Esto sugiere que los límites máximos permitidos por la legislación para suelos con uso agrícola y residencial, especialmente, deben ser revisados bajo estas consideraciones.

Los suelos superficiales ubicados al sur de la fundición de plomo presentaron mayores valores de Pb que los suelos en otras direcciones (Tabla 1.2), lo cual muestra la incidencia de los vientos predominantes sobre las emisiones de chimenea, si bien la industria dejó de operar en el año 2005. La TS mostró las concentraciones más altas de Pb (pseudototal y

movilizable) y estas se mantuvieron elevadas a mayores distancias de la fuente que las concentraciones de Pb en suelos de las otras transectas. Los resultados del ANOVA resaltaron una marcada disminución en la concentración de Pb después de los primeros metros de cada transecta, con grandes diferencias entre el primer sitio y el resto, lo cual enmascara los gradientes hacia los sitios más remotos.

Tabla 1.3. Valores máximos permitidos según la legislación argentina y canadiense para la concentración pseudototal de metales pesados (mg kg^{-1} PS) según los diferentes usos del suelo.

Elemento	Uso del Suelo					
	Agrícola		Residencial		Industrial	
	GCS ^{a,b}	GCS-SA ^c	GCS ^{a,b}	GCS-SA ^c	GCS ^{a,b}	GCS-SA ^c
Pb	375	70	500	140	1000	600
Cu	150	63	100	63	500	91
Co	40	-	50	-	300	-
Ni	150	50	100	50	500	50
Zn	600	200	500	200	1500	360

GCS = Guía para calidad de suelo; GCS-SA = guía para calidad de suelo para la salud ambiental. PS= peso seco. ^aLegislación Argentina (Argentina, 1991). ^bCCME = Consejo Canadiense de Ministros de Ambiente (CCME, 1991). ^cCCME (2007). Se destacan en negrita los valores considerados límite puesto a que el estudio se desarrolló en suelos agrícolas fundamentalmente y los valores GCS son los aplicables según legislación argentina.

En relación a la estadística descriptiva de las concentraciones de metales pesados y de las propiedades del suelo debajo de pilas de escoria y a diez metros de distancia de éstas, las concentraciones de Pb revelan que el correspondiente a la fracción pseudototal superó los límites para los usos agrícola, residencial e industrial del suelo en las muestras tomadas debajo de la pila de escorias (Tabla 1.4). Sin embargo, estos valores se encontraron dentro de los límites máximos permitidos por la legislación en muestras de suelo del sitio de muestreo ubicado a diez metros de distancia de la pila (aunque las concentraciones fueron mayores que en los sitios control). Las diferencias entre las muestras tomadas debajo de la pila y a 10 m de distancia de ella, se analizaron mediante ANOVA, y no se encontraron diferencias significativas para ninguna de las fracciones, pese a la fuerte tendencia de disminución observada. Estadísticamente, esto se debió a la gran desviación estándar en torno a los valores medios; aspecto que reveló la heterogeneidad en la composición de las escorias, que en los procesos de erosión y lixiviación que sufren en el suelo liberan principalmente Pb. Resultados similares fueron encontrados y reportados por Ettler et al. (2004) en la República Checa, donde demostraron que las escorias producidas por el

reciclado de baterías ácidas de automóviles empleando viejas tecnologías tiene como consecuencia una considerable cantidad de plomo en el suelo; y por Adie y Osibanjo (2009) en Nigeria. En relación a la concentración de los demás metales analizados en suelos, sólo Cu, Fe, Ni, y Ni_{HCl} mostraron concentraciones significativamente mayores que las encontradas en los sitios control.

El porcentaje de materia orgánica (%MO) y la conductividad eléctrica (CE) en suelos del sitio donde había depósito de escorias, presentaron valores ligeramente superiores a los encontrados a 10 m de la pila, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. No obstante, %MO y CE fueron significativamente inferiores en los sitios control, tanto en comparación con las muestras tomadas bajo la pila como a 10 m de la misma (Tabla 1.4.).

Tabla 1.4. Estadística descriptiva de las concentraciones de metales pesados en suelos superficiales (mg kg⁻¹ PS), pH, % MO y CE bajo una pila de escoria (n = 3) y a diez metros la misma (n = 3).

Elemento	Bajo la pila de escorias				10 m desde la pila de escorias			
	Mínimo	Máximo	Media	Desvío Estándar	Mínimo	Máximo	Media	Desvío Estándar
Pb	276	4568	2026	1929	29,1	147	86,1	47,1
Pb _{HCl}	230	3257	1592	1297	36,4	161	97,6	53,6
Cu	6,5	21,8	11,9	7,0	4,4	8,2	6,2	1,7
Cu _{HCl}	3,10	16,2	7,58	6,27	2,80	3,00	2,87	0,08
Co	5,5	8,6	7,6	1,2	11,8	18,7	15,2	3,3
Co _{HCl}	2,6	2,9	2,7	0,1	2,9	3,2	3,0	0,1
Ni	3,3	9,9	5,7	3,1	3,3	5,5	4,3	1,0
Ni _{HCl}	3,4	11,4	6,2	3,9	2,4	2,6	2,5	0,1
Fe	3965	18924	12384	5639	8425	17977	12492	3431
Fe _{HCl}	348	1610	772	563	409	868	523	173
Zn	21,3	28,5	24,4	3,19	19,5	32,8	25,7	6,05
Zn _{HCl}	7,10	11,6	9,42	1,75	5,00	7,40	6,13	0,87
Mn	369	416	391	15,4	325	444	383	48,9
Mn _{HCl}	263	304	284	15,7	286	320	302	12,4
pH	6,68	7,50	6,97	0,41	6,80	6,82	6,81	0,01
%MO	5,01	6,83	6,12	0,87	5,63	5,84	5,73	0,09
CE	160	317	221	75,2	117	256	182	62,4

Los elementos sin subíndice indican concentración en la fracción pseudototal. El subíndice HCl indica metales pesados extraídos con HCl 0,5 M. Para los controles interno y externo, los datos presentados corresponden a los valores medios.

1.3.2. Influencia de los vientos predominantes

Se realizaron ANOVAs dentro de cada transecta, los mismos fueron presentados en la Tabla 1.2. El análisis de la varianza (ANOVA) dentro de cada transecta no permitió inferir claramente la influencia de los vientos sobre la dispersión de metales (Tabla 1.2). En contraste, se observaron diferencias significativas entre transectas, con concentraciones de Pb (pseudototal y extraíble con HCl 0,5M) significativamente mayores en TS (Tabla 1.5.), resultados que concuerdan con los vientos predominantes del norte. Además, las concentraciones de Pb extraíbles con HCl 0,5M en TN fueron más bajas que las encontradas en la TS, al mismo tiempo que superaron las encontrados en las TE y TO. Las concentraciones de Pb en estas dos últimas transectas no mostraron diferencias significativas, lo que se relaciona con la segunda dirección predominante del viento, ya que muchos días al año se presentan fuertes vientos del sur. El resto de los metales estudiados no mostraron tendencias claras para este análisis.

Tabla 1.5. Comparación de la concentración de metales pesados en suelos entre las distintas transectas analizadas mediante análisis de la varianza (ANOVA) utilizando la dirección del viento como criterio de clasificación.

Elemento	Significancia	Medias por Transecta (mg kg ⁻¹ PS)				Diferencias entre transectas			
		TS	TN	TE	TO	TS	TN	TE	TO
Pb	**	1686	431	259	188	a	b	b	b
Pb_{HCl}	**	675	442	181	233	a	ab	b	b
Cu	**	9,9	9,9	10,9	5,7	a	a	a	b
Cu_{HCl}	*	6,1	3,4	4,6	2,9	a	ab	ab	b
Co	***	7,3	15,3	17,0	12,0	c	a	a	b
Co_{HCl}	***	2,5	2,8	3,2	3,3	c	b	a	a
Ni	***	3,4	4,4	5,5	5,1	c	b	a	ab
Ni_{HCl}	*	2,6	2,3	2,7	2,6	ab	b	a	ab
Fe	**	11015	8749	11347	9507	a	b	a	ab
Fe_{HCl}	***	641	478	685	414	a	b	a	b
Zn	ns	39,7	27,8	37,3	26,8				
Zn_{HCl}	**	11,8	4,0	8,6	7,6	a	b	ab	ab
Mn	***	323	530	582	384	c	a	a	b
Mn_{HCl}	***	253	253	251	307	b	b	b	a

Los elementos sin subíndice indican concentración en la fracción pseudototal. El subíndice HCl indica metales pesados extraídos con HCl 0,5 M. Para los controles interno y externo, los datos presentados corresponden a los valores medios. TS: Transecta Sur; TN: Transecta Norte; TE: Transecta Este; TO: Transecta Oeste.

ns = no significativo - * Significativo con p<0,05. - ** Significativo con p<0,01. - *** Significativo con p<0,001.

Los resultados de la distribución espacial de Pb en el área de estudio proporcionan evidencia de que la fundición de baterías fue una importante fuente de emisión de Pb que impactó en la composición, y contaminación, de la capa superior del suelo, aunque no constituyó una fuente importante de otros metales.

1.3.3. Relación entre las concentraciones de metales en el suelo y la distancia a la fuente

En la Tabla 1.6. se muestran los resultados de las regresiones curvas simples y de los modelos de regresión lineal múltiple para Pb en los suelos superficiales estudiados, (se presentan sólo las regresiones con resultados significativos). Teniendo en cuenta todo el conjunto de datos, la concentración de Pb tuvo un ajuste aceptable a un modelo potencial en ambas fracciones de suelo analizadas, lo que indica concentraciones menores a medida que la distancia al predio donde estuvo la fundición, aumenta. El decaimiento principal ocurre en los primeros 100 metros, y según las predicciones dadas por el modelo y las directrices de calidad del suelo (Tabla 1.3.) dadas por la legislación, la concentración de Pb se torna aceptable para suelos con uso agrícola a partir de una distancia de 104 m desde la fuente, mientras que para un uso residencial se alcanzan valores aceptables de plomo en suelos a partir de 86 m desde la fuente en cualquier dirección.

Los resultados de las regresiones en cada transecta (Tabla 1.6.), muestran ajustes óptimos en todos los casos, excepto para la TE. Sin embargo, esta excepción puede deberse al uso histórico del suelo en el sector correspondiente a esta transecta. Del mismo se extraían en el pasado los primeros horizontes del suelo, como materia prima para fabricar ladrillos antes de emplearse con fines agrícolas. Las muestras de suelo del sitio 24, ubicado a 120 metros de distancia de la fundición en dirección NE ($31^{\circ} 33' 32.04''$ S; $64^{\circ} 11' 6.52''$ O) correspondieron al patio de una vivienda junto a la fundición, sector donde el suelo no se empleó para la fabricación de ladrillos. Estas muestras presentaron una elevada concentración de plomo (1050 mg kg^{-1} PS) en la fracción pseudototal. Este hallazgo demuestra la influencia del uso del suelo en la capacidad de predicción del modelo en la dirección Este.

Los resultados de los análisis de regresión utilizando el conjunto completo de datos proporciona predicciones muy útiles, pero su precisión mejora cuando se analizan los datos transecta por transecta (alcanzándose R^2 de alrededor de 0,9). De acuerdo con estas predicciones, las distancias necesarias para cumplir con las normas de calidad del suelo según sus usos (Tabla 1.3.) son 135 m, 110 m, y 68 m para los usos agrícola, residencial e industrial, respectivamente, en la dirección norte; 221 m, 197 m, y 149 m, en dirección sur; 58 m, 47 m, y 29 m, en dirección este; y 59 m, 47 m, y 27 m, en dirección oeste.

Tabla 1.6. Regresiones simples para la concentración de Pb en suelos superficiales alrededor de una fundición de baterías.

Modelo predictivo en todas la direcciones				
	R^2	Constante	Parámetros	Modelo
Pb	0,637***	36,8E+04 ($\pm 17,5E+04$)*	x distancia ^{-1,483 ($\pm 0,085$)***}	Potencial
Pb _{HCl}	0,674***	30,3E+04 ($\pm 13,1E+04$)*	x distancia ^{-1,469 ($\pm 0,078$)***}	Potencial
Modelo predictivo hacia el Sur				
	R^2	Constante	Parámetros	Modelo
Pb	0,867***	2,4E+08 ($\pm 1,8E+08$) ^{ns}	x distancia ^{-2,477 ($\pm 0,133$)***}	Potencial
Pb _{HCl}	0,925***	4,23E+07 ($\pm 2,1E+07$)*	x distancia ^{-2,192 ($\pm 0,086$)***}	Potencial
Modelo predictivo hacia el Norte				
	R^2	Constante	Parámetros	Modelo
Pb	0,917***	40,2E+04 ($\pm 17,1E+04$)*	x distancia ^{-1,422 ($\pm 0,079$)***}	Potencial
Pb _{HCl}	0,917***	68,8E+04 ($\pm 31,5E+04$)*	x distancia ^{-1,539 ($\pm 0,086$)***}	Potencial
Modelo predictivo hacia el Este				
	R^2	Constante	Parámetros	Modelo
Pb	0,583***	98,572 ($\pm 89,255$) ^{ns}	x distancia ^{-1,37 ($\pm 0,179$)***}	Potencial
Pb _{HCl}	0,656***	84,211 ($\pm 66,059$) ^{ns}	x distancia ^{-1,383 ($\pm 0,155$)***}	Potencial
Modelo predictivo hacia el Oeste				
	R^2	Constante	Parámetros	Modelo
Pb	0,84***	66,103 ($\pm 31,444$)*	x distancia ^{-1,269 ($\pm 0,081$)***}	Potencial
Pb _{HCl}	0,845***	133,214 ($\pm 68,680$) ^{ns}	x distancia ^{-1,403 ($\pm 0,087$)***}	Potencial

Los elementos sin subíndice indican concentración en la fracción pseudototal. El subíndice HCl indica metales pesados extraídos con HCl 0,5 M. Para los controles interno y externo, los datos presentados corresponden a los valores medios. ns = no significativo - * Significativo con $p < 0,05$. - ** Significativo con $p < 0,01$. - *** Significativo con $p < 0,001$.

En algunos casos, (Ni para TS; Co_{HCl} para TN, y Cu_{HCl}, Ni_{HCl} y Zn_{HCl} para TE) el coeficiente de regresión se incrementó cuando el modelo empleado correspondió al de regresión lineal múltiple (Tabla 1.7.), resultados comparables a los informados por

Bermúdez et al. (2010a). Esto ocurrió principalmente en la fracción extraíble con HCl 0,5M, lo que revela la importancia de variables como el pH, %MO, y la CE como reguladoras de las fracciones de metales presentes en el suelo más disponibles para las plantas, los animales y el hombre.

Para Cu, sólo se lograron predicciones con R^2 superiores a 0,5 en las TS, TN, y TE, principalmente para la fracción movilizable (Figura 1.3). De hecho, para la TE fue necesario incorporar más variables aparte de la distancia (Tabla 1.7). En todas las direcciones, Cu decayó con la distancia, lo que indica que la fundición de baterías fue una fuente para este metal en suelos. El Cu es un aditivo utilizado en las baterías a base de plomo. Otros autores han informado un incremento del mismo metal en suelos aledaños a fundiciones de la baterías (Nedwed y Clifford, 1997).

Tabla 1. 7. Análisis de regresiones múltiple para la concentración de metales pesados, %MO, pH y CE en suelos superficiales alrededor de una fundición de reciclaje de baterías.

Elemento	R^2	Constante	Parámetros	Modelo
Sur				
Ni	0,570 ^{***}	2 ($\pm 1,91$) ^{ns}	$-0,599 (\pm 0,221)^{**} \times \text{pH} + 0,929 (\pm 0,161)^{***} \times \% \text{MO} + 0,004 (\pm 0,001)^{**} \times \text{CE}$	Lineal
Norte				
Co _{HCl}	0,630 ^{***}	2,214 ($\pm 0,567$) ^{**}	$-0,002 (\pm 0)^{**} \times \text{distancia} + 0,365 (\pm 0,135)^* \times \text{pH} - 0,211 (\pm 0,140)^{ns} \times \% \text{MO}$	Lineal
Este				
Cu _{HCl}	0,605 ^{***}	-35,6 ($\pm 15,5$) [*]	$-0,005 (\pm 0,002)^{ns} \times \text{distancia} + 5,921 (\pm 2,399)^* \times \text{pH} + 0,017 (\pm 0,004)^{***} \times \text{CE}$	Lineal
Ni _{HCl}	0,542 ^{***}	-1,023 ($\pm 1,761$) ^{ns}	$0,001 (\pm 0)^{**} \times \text{distancia} + 0,516 (\pm 0,272)^{ns} \times \text{pH} + 0,002 (\pm 0)^{***} \times \text{CE}$	Lineal
Zn _{HCl}	0,876 ^{***}	-77,676 ($\pm 16,88$) ^{***}	$-0,008 (\pm 0,003)^{**} \times \text{distancia} + 12,603 (\pm 2,605)^{***} \times \text{pH} + 0,04 (\pm 0,004)^{***} \times \text{CE}$	Lineal

Distancia: a la fundición en m. CE = conductividad eléctrica. % MO = porcentaje de materia orgánica. Los elementos sin subíndice indican concentración en la fracción pseudototal del suelo. El subíndice HCl indica metales pesados extraídos con HCl 0,5 M. Para los controles interno y externo, los datos presentados corresponden a los valores medios. ns = no significativo - * Significativo con $p < 0,05$. - ** Significativo con $p < 0,01$. - *** Significativo con $p < 0,001$.

En las transectas TS, TN y TE, las concentraciones de Co fueron predecibles con un R^2 superior a 0,5 (Figura 1.3. y Tabla 1.7), principalmente para la fracción extraíble con HCl 0,5M, habiéndose encontrado una relación positiva con la distancia a la fuente. La

concentración Co aumentó con la distancia en dirección sur y este, aunque disminuyó ligeramente en dirección norte. Esto puede indicar una posible fuente alternativa de Co en dirección SE.

En el caso de Ni, solo fue posible obtener un modelo predictivo con R^2 superior a 0,5 en la TN (Figura 1.3.), mostrando sólo una ligera reducción con la distancia, lo que indica que la fundición no constituyó una fuente importante para Ni. Resultados similares fueron reportados por Adie y Osibanjo (2009).

Finalmente, no fue posible encontrar modelos predictivos robustos para las concentraciones del resto de los metales, por lo que las concentraciones de Fe, Mn, y Zn en suelos superficiales no parecen haber sido influenciadas por la fundición de baterías.

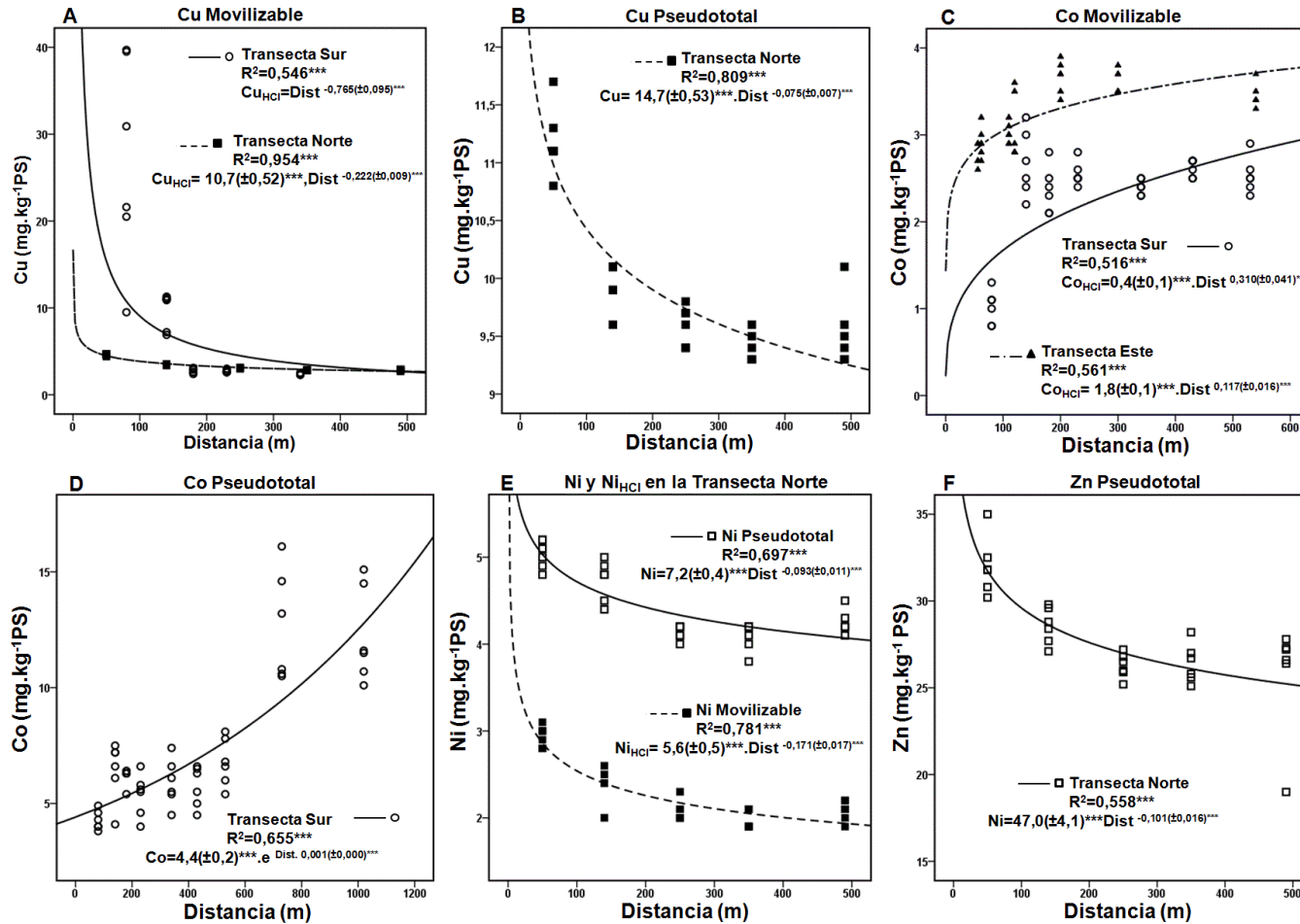


Figura 1.3. Análisis de regresión simple para la concentración de metales pesados en los suelos superficiales alrededor de una fundición de baterías. Sólo las regresiones con coeficientes significativos se presentan en esta figura. A) Cu movilizable en direcciones norte y sur. B) Cu pseudototal en dirección norte. C) Co movilizable en direcciones sur y este. D) Co pseudototal en dirección sur. E) Ni movilizable y pseudototal en dirección norte. F) Zn pseudototal en dirección norte.

1.3.4. Análisis de correlación

Los coeficientes de Spearman calculados para Pb y el resto de los metales en ambas fracciones se exponen en la Tabla 1.8. La concentración de Pb correlacionó positivamente con Pb_{HCl}, Cu, Ni_{HCl}, Fe y Zn, pero mostró una correlación negativa con Co_{HCl} y Mn_{HCl}. Estos resultados concuerdan con los resultados del análisis de regresión reportado anteriormente, donde Fe, Mn y Zn no parecen ser dependientes de la planta de fundición, mientras que la correlación entre estos metales y Pb fue significativa. Por otro lado, se encontró una correlación positiva entre Co y Mn, pero estos metales se correlacionaron negativamente con Pb. Esto podría revelar una posible fuente común a los dos y distinta de fundición de baterías; lo que es más, su enriquecimiento suele atribuirse al aporte litogénico ya que estos metales son componentes naturales en suelos (Facchinelli et al., 2001; Micó et al., 2006).

Tabla 1.8. Coeficientes de correlación de Spearman entre los metales pesados estudiados en suelos superficiales en inmediaciones de una fundición de baterías en Bower, Córdoba.

	Pb	Pb _{HCl}	Cu	Cu _{HCl}	Co	Co _{HCl}	Ni	Ni _{HCl}	Fe	Fe _{HCl}	Zn	Zn _{HCl}	Mn
Pb	1												
Pb_{HCl}	,98 ^{***}	1											
Cu	,66 ^{***}	,58 ^{***}	1										
Cu_{HCl}	,64 ^{***}	,60 ^{***}	,8 ^{***}	1									
Co	,08 ^{ns}	,01 ^{ns}	,52 ^{***}	,46 ^{***}	1								
Co_{HCl}	-,48 ^{***}	-,5 ^{***}	-,08 ^{ns}	,09 ^{ns}	,41 ^{***}	1							
Ni	,02 ^{ns}	-,02 ^{ns}	,45 ^{***}	,36 ^{***}	,38 ^{***}	,36 ^{***}	1						
Ni_{HCl}	,18 [*]	,16 [*]	,44 ^{***}	,65 ^{***}	,22 ^{**}	,48 ^{***}	,56 ^{***}	1					
Fe	,27 ^{***}	,23 ^{**}	,29 ^{***}	,24 ^{**}	,13 ^{ns}	-,16 [*]	,12 ^{ns}	,08 ^{ns}	1				
Fe_{HCl}	,25 ^{**}	,19 ^{**}	,44 ^{***}	,41 ^{***}	,19 [*]	-,05 ^{ns}	,07 ^{ns}	,29 ^{***}	,20 ^{**}	1			
Zn	,45 ^{***}	,37 ^{***}	,78 ^{***}	,72 ^{***}	,44 ^{***}	,16 [*]	,54 ^{***}	,66 ^{***}	,47 ^{***}	,51 ^{***}	1		
Zn_{HCl}	,15 [*]	,15 ^{ns}	,2 ^{**}	,42 ^{***}	,04 ^{ns}	,3 ^{***}	,48 ^{***}	,75 ^{***}	,07 ^{ns}	,151 [*]	,5 ^{***}	1	
Mn	,05 ^{ns}	-,02 ^{ns}	,55 ^{***}	,44 ^{***}	,83 ^{***}	,44 ^{***}	,31 ^{***}	,22 ^{**}	,05 ^{ns}	,35 ^{***}	,48 ^{***}	-,07 ^{ns}	1
Mn_{HCl}	-,52 ^{***}	-,5 ^{***}	-,48 ^{***}	-,23 ^{**}	-,08 ^{ns}	,59 ^{***}	-,07 ^{ns}	,22 ^{**}	-,16 [*]	-,22 ^{**}	-,21 ^{**}	,2 ^{**}	-,11 ^{ns}

Los metales sin subíndice indican concentración en la fracción pseudototal. El subíndice HCl indica metales pesados extraídos con HCl 0,5 M. Para los controles interno y externo, los datos presentados corresponden a los valores medios. ns = no significativo - * Significativo con p<0,05. - ** Significativo con p<0,01. - *** Significativo con p<0,001.

1.4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio confirman un gradiente de contaminación de los suelos superficiales aledaños a una antigua fundición de baterías, como consecuencia de las emisiones de contaminantes al aire durante el funcionamiento de la planta junto con la deposición de escorias. Las concentraciones de plomo encontradas cerca de la fundición superaron varias veces los límites permitidos en la legislación nacional e internacional para suelos de uso agrícola. Por lo tanto, teniendo en cuenta el potencial riesgo toxicológico observado para la salud del ambiente, para la salud humana y la de la vida silvestre de la zona de estudio, sería menester aplicar políticas de investigación y remediación en la zona a fin de reducir los impactos negativos de esta contaminación del suelo.

Un hallazgo importante en este estudio fue encontrar una concentración de Pb movilizable similar a la concentración de Pb pseudototal en suelos superficiales afectados por el impacto de la fundición de plomo. Esta condición en suelos con uso agrícola (cultivos de soja y trigo en esa localidad), puede convertirse en un riesgo para la salud humana por el ingreso de Pb en los granos tal como se ha informado en trabajos previos (Salazar et al., 2012; Bermudez et al., 2011) además de ser una vía de ingreso para el ganado y a su vez humana, lo que implica un riesgo ya que se trata de un tóxico. Teniendo en cuenta estos resultados, es necesario llevar a cabo una evaluación y modificación de las directrices que preservan la calidad de suelos agrícolas, considerando la fracción HCl 0,5 M de metales u otra extracción similar que represente fracciones biodisponibles presentes en el suelo.

En relación al objetivo central de esta tesis, los resultados encontrados en esta etapa son un fuerte indicio de que el contaminante Pb puede estar siendo translocado a la vegetación silvestre y los cultivos que crecen en el área. Esto sugiere que el sitio seleccionado para su estudio presenta condiciones óptimas a fin de realizar un screening de especies resistentes y acumuladoras de Pb.

2. Capítulo II

Acumulación de plomo en plantas silvestres que crecen en suelos contaminados. Relevamiento de especies nativas aptas para fitorremediación.

Resumen

Se estudiaron suelos contaminados con concentraciones elevadas de plomo en una zona agrícola y residencial que rodea a una antigua planta de fundición de plomo en Bouwer, provincia de Córdoba, Argentina. El objetivo fue evaluar la capacidad para fitoextracción de este contaminante por parte de especies vegetales silvestres y nativas que crecen en estos suelos.

Se determinó la concentración de Pb en hojas, tallos y raíces de diez especies recolectadas en diez sitios de muestreo a lo largo de un gradiente de concentración de plomo en el suelo. Se encontraron dos especies nativas, *Tagetes minuta* L. y *Bidens pilosa* L. que acumularon elevadas cantidades de Pb en sus hojas ($380,5 \text{ mg g}^{-1}$ PS, y $100,6 \text{ mg g}^{-1}$ PS, respectivamente) cuando las concentraciones del metal en el suelo eran de $1600 \text{ mg Pb g}^{-1}$ PS en la fracción extraíble con HCl 0,5M. Por lo tanto se estableció que *Tagetes minuta* L. y *Bidens pilosa* L. tienen un potencial considerable para la fitorremediación de suelos contaminados con Pb. En el mismo sitio de muestreo, *Sorghum halepense* (L.) Pers., una especie no nativa, bioacumuló elevados niveles de Pb en sus raíces ($1406,8 \text{ mg g}^{-1}$ PS), lo que permite proponer a esta especie como una potencial fitoestabilizadora del metal en suelos. Los resultados de este estudio deberían servir como puntapié para profundizar los factores que regulan la tolerancia, incorporación y translocación de este metal en estas especies a fin de desarrollar programas de recuperación de suelos.

2.1. Introducción

Como se expuso anteriormente, el problema de la contaminación de los suelos por metales pesados representa un desafío para las instituciones públicas y privadas. En este contexto la fitorremediación tiene el potencial de dar respuesta a este problema aunque diversos factores determinantes deben ser investigados todavía para poder llevarla a la práctica (Ghosh y Singh, 2005). Dentro de las diversas formas de aplicar fitorremediación se destaca la fitoextracción. Ésta constituye la mejor manera de remover y aislar los contaminantes del suelo sin destruir su estructura ni perder su fertilidad (EPA, 2000). Descubrir especies hiperacumuladoras es la principal manera de impulsar esta tecnología

puesto que pocas especies presentan esta capacidad (Ghosh y Singh, 2005). Para que resulte factible aplicar la técnica de fitoextracción de un metal, las plantas utilizadas deben extraer grandes concentraciones del contaminante mediante sus raíces, translocarlas a la biomasa aérea y producir una gran cantidad de biomasa. Si bien las hiperacumuladoras logran cumplir los requisitos de extracción y translocación, a menudo presentan características desfavorables como crecimiento lento, escasa biomasa y sistema radical poco desarrollado (Brooks et al., 1998). Esto muestra que en ocasiones las especies hiperacumuladoras pueden ser eficaces, ya que los procesos de acumulación y translocación ocurren, pero poco eficiente, ya que el rendimiento en términos de tasa neta de extracción no es elevado.

Algunos estudios han reportado el uso de sitios contaminados como banco de semillas con genes de tolerancia al contaminante, obteniendo óptimos resultados en la fitorremediación de suelos contaminados con metales a partir de dichas semillas (Gleba et al., 1999). Esta práctica implica un impacto de intervención mínimo (Becerril Soto et al., 2007) ya que en el mismo sitio problema se puede encontrar una solución que por un lado no implique introducir especies que alteren el balance ecológico y que por otro ya está adaptada a las condiciones reinantes y de esta manera no requerirá una inversión de esfuerzos adicional (Ghosh y Singh, 2005).

Sin embargo, la implementación de esta tecnología supone el estudio de ciertas condiciones como son la capacidad de la planta para extraer los metales del suelo, la producción de biomasa, el órgano de la planta en el que se acumulan los metales, el efecto del clima y la estacionalidad sobre la especie, la biodisponibilidad de los metales en el suelo y los niveles de toxicidad de éstos para la especie, y la competencia entre los diferentes iones metálicos (Montes Botella, 2001). Muchos de estos problemas se pueden evitar mediante el conocimiento de la fisiología y condiciones óptimas de cultivo de estas especies, si se realiza una adecuada selección de las mismas y de las condiciones óptimas de cultivo, considerando los factores mencionados. A pesar de que la fitorremediación es un método que se utiliza actualmente en muchas partes del mundo, los estudios son escasos en Argentina y especialmente aquellos que estudien especies nativas con la finalidad de que estas sean empleadas para la eliminación de metales pesados de suelos (Arreghini et al., 2006; Bonfranceschi et al., 2009; Flocco et al., 2002; Torri et al., 2009).

En este capítulo se analiza la relación entre las concentraciones de Pb en suelo y plantas de distintas especies que crecen en una zona agrícola y residencial en torno a una antigua planta de reciclado de baterías. Numerosos estudios han informado que este tipo de fundiciones son una importante fuente de contaminación por Pb en los suelos circundantes (Cala y Kunimine, 2003; Ramírez, 2008) y en este caso particular la presencia de elevadas concentraciones de este contaminante en suelos quedó demostrada (Capítulo I). La comunidad vegetal que crece alrededor de la fundición representa una gran oportunidad para estudiar la capacidad de plantas nativas para tolerar altos niveles de plomo y acumularlo en sus tejidos, esto permitiría seleccionar especies aptas para ser empleadas en la fitorremediación de suelos contaminados con plomo. Por tal motivo, el propósito de este estudio fue investigar la transferencia de plomo desde suelo a especies nativas analizando la translocación del metal a distintos órganos de las plantas y las tasas de acumulación de Pb en cada uno de ellos. Las especies herbáceas anuales, por ser en su mayoría plantas ruderales, tienen una rápida aclimatación y adaptación al medio en el que se desarrolla su población. En el caso de la fundición de Bouwer han transcurrido más de 25 años con presencia de Pb en el ambiente, por lo que las especies anuales ruderales llevan más de 25 generaciones sobreviviendo y reproduciéndose en esas condiciones. Cada especie logra este éxito mediante diferentes mecanismos, siendo esperable que algunas de ellas hiperacumulen el contaminante en sus órganos aéreos. También es esperable que la misma especie no se comporte de la misma manera en presencia de diferentes niveles de Pb en suelo, presentando cada una cierto nivel de tolerancia.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Área de estudio

El área de estudio, al igual que en el capítulo anterior, se localizó en Bouwer, a 18 kilómetros al sur de la ciudad de Córdoba, Argentina (Figura 2.1.). Esta tiene una población de 1500 habitantes. El suelo en el sitio es un Haplustol éntico y el clima es templado, con una temperatura media anual de unos 15 ° C y una precipitación media anual de 500 a 900 mm (Gorgas y Tassile, 2003).

Como se expuso previamente, el área fue afectada por una antigua planta de reciclado de baterías que operó desde el año 1984 hasta el año 2005 (31 ° 33'34 .02 "S; 64 ° 11'9 .05" O). Esta fundición fue cerrada debido a que se detectaron altos niveles de emisión al aire de plomo debido a la falta de control tanto en la chimenea como a la eliminación inadecuada de residuos sólidos (escorias). Además, se informaron enfermedades en la población de Bouwer y trabajadores de la planta de fundición relacionadas con el plomo (La Voz del Interior, 2006). Las mediciones de plomo en las emisiones, llevadas a cabo por las autoridades de la provincia de Córdoba, mostraron valores de plomo 35 veces superiores a los límites máximos permitidos por la legislación argentina para aire (Comuna de Bouwer, 2008).

Aunque se cerró la fundición, el sitio no fue tratado y todavía hay escorias dispersas por la ciudad y sus alrededores, con el riesgo potencial que esto supone para la salud de la población y la calidad de los cultivos. En las proximidades de la fundición de plomo abandonada, el uso del suelo es principalmente agrícola (soja, sorgo, trigo), y residencial. También existen parcelas (parches) de suelos no empleados para estos fines donde crecen plantas silvestres.

En esta etapa se eligieron diez sitios de muestreo de vegetación y suelos superficiales (Figura 2.1.) con el fin de abarcar un gradiente de concentración de Pb. Estos sitios se clasificaron en orden descendente de concentración de plomo en las fracciones pseudototal y extraíble con HCl 0,5M (el sitio 1 tiene la más alta concentración de Pb y los sitios 9 y 10 constituyen sitios de referencia).

Con el fin de detectar especies de plantas nativas, que por sus características de tolerancia al plomo y sus niveles de acumulación del metal pudieran ser empleadas en la fitorremediación de suelos contaminados, se recolectaron en cada sitio las especies herbáceas más abundantes que crecían naturalmente.

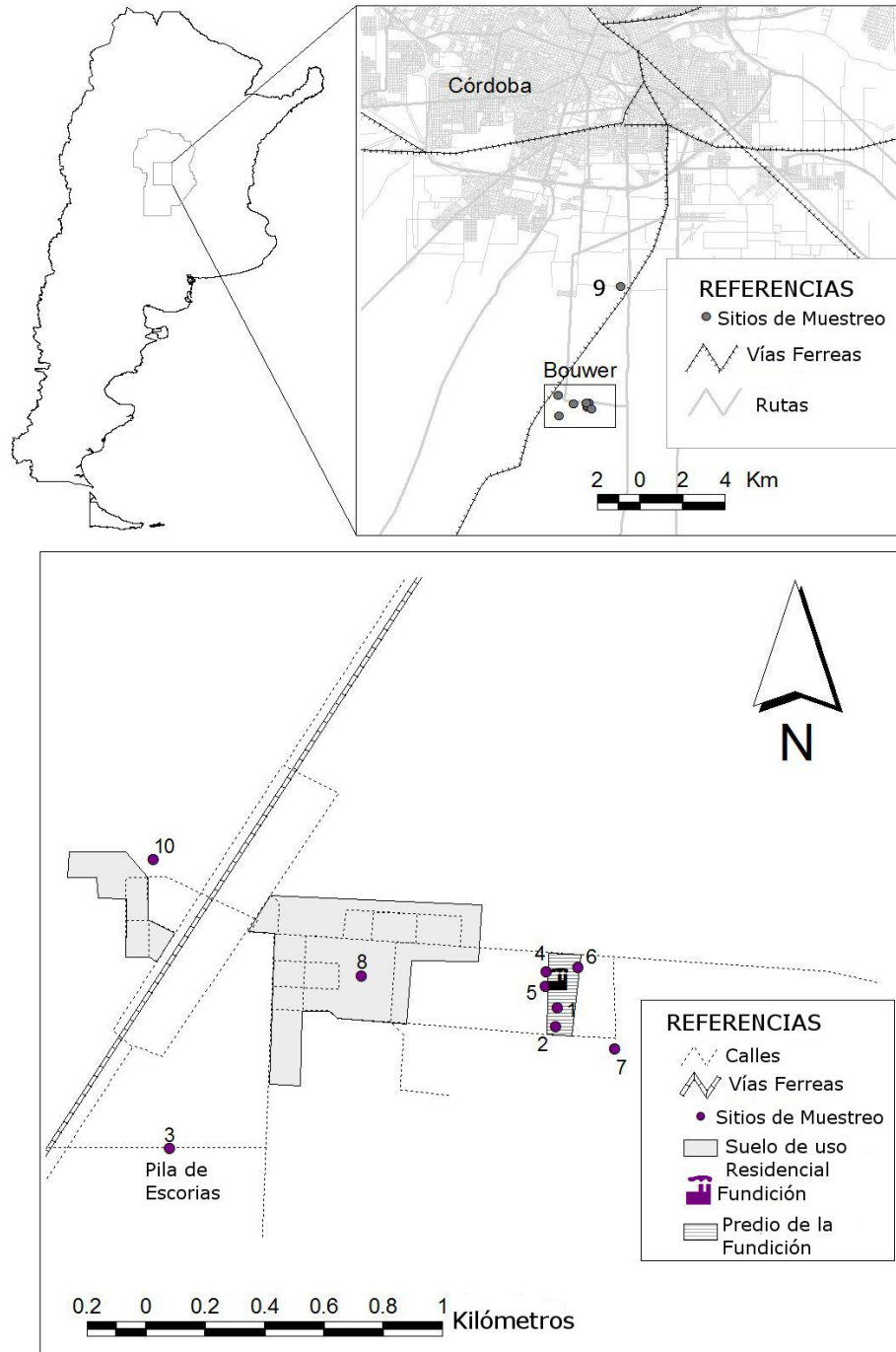


Figura 2.1. Área de muestreo de vegetación y suelos en Córdoba (Argentina) alrededor de una fundición de plomo localizada en Bouwer. El sitio 9 se encuentra entre Bouwer y Córdoba Capital y se lo puede ubicar en el recuadro superior derecho como un punto aislado.

2.2.2. Procedimiento de muestreo

Se recogieron muestras compuestas (n = 9 en cada punto) de suelo superficial a una profundidad de 0-10 cm, removiendo previamente los objetos extraños presentes en los mismos, quedando representado cada punto por tres muestras independientes. Los suelos fueron recolectados en bolsas de plástico, y una vez en el laboratorio fueron secados en estufa a 40 °C durante 24 horas. Posteriormente se tamizaron a <2 mm (utilizando un tamiz de polietileno) y se almacenaron en la oscuridad hasta la realización de los procedimientos analíticos (Bäckström et al., 2004).

La recolección de muestras vegetales se realizó al final de la temporada de verano, cuando las plantas estaban en flor. Se recogieron aproximadamente 10 ejemplares de cada una de las especies herbáceas más abundantes en cada sitio (incluyendo las raíces, tallos, hojas). Un ejemplar de cada especie fue llevado al Museo Botánico de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, IMBIV, CONICET-UNC (códigos de registro Salazar J. 1 a 10, CORD-365.854 a CORD-365.864) para su identificación.

Las plantas fueron divididas en el campo, las raíces (junto con el material de la rizosfera) se mantuvieron en bolsas de plástico hasta llegar al laboratorio, mientras que la parte aérea (tallos y hojas) se colocaron en bolsas de papel. Una vez en el laboratorio, las muestras se lavaron con agua ultrapura (Milli-Q) y luego fueron secadas en estufa a 40 °C hasta alcanzar peso seco (PS) constante. Para cada sitio de muestreo, para cada especie, y para cada órgano de la planta, se obtuvieron tres muestras compuestas formadas con tres ejemplares cada una. Las mismas fueron trituradas y se almacenaron en oscuridad hasta la realización de los análisis químicos. El décimo ejemplar se registró en el herbario del Museo Botánico Córdoba.

2.2.3. Análisis físico-químicos

2.2.3.1. Conductividad eléctrica, pH y porcentaje de materia orgánica en los suelos superficiales

El pH y la conductividad eléctrica (CE) de los suelos superficiales se midieron en una suspensión 1:5 suelo:agua ultrapura, la que se dejó en reposo durante 10 min después de 30

minutos de agitación a temperatura ambiente (Bäckström et al., 2004). Con el fin de calcular el porcentaje de materia orgánica (%MO) las muestras se secaron a 105 ° C hasta alcanzar peso constante (Al-Khashman y Shawabkeh, 2006), y luego se procedió según Peltola y Åström (2003). El contenido de materia orgánica se calculó por diferencia de peso después de tratar 10 g de muestra seca a una mufla a 500 °C durante cuatro horas.

2.2.3.2. Metales pesados en suelos superficiales

Los análisis realizados para la cuantificación de metales en los suelos en el Capítulo I se repitieron en esta etapa para suelos colectados en cada sitio en el que se recolectaron plantas. Es decir que con la misma metodología se estudiaron las fracciones pseudototal y extraíble con HCl 0,5M para cada metal.

2.2.3.3. Concentración de plomo en órganos vegetales

Las concentraciones de Pb en los órganos de las plantas recolectadas se determinaron por triplicado según Bermudez et al. (2009). En primer lugar, 3 g PS de cada órgano (hojas, tallos y raíces) se llevaron a mufla a 450 ° C durante cuatro horas. Luego, se realizó la extracción de los metales agregando 3 mL de una mezcla de HNO₃ conc. y HCl al 20% en una relación 1:5 V/V. La suspensión se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 4 h y transcurrido ese tiempo se filtró con papel de filtro de 2 µm (Munktell, Alemania) y en el sobrenadante se analizaron los metales mediante espectrofotometría de absorción atómica (AAS) empleando un espectrómetro de absorción atómica de llama (FASS, Perkin-Elmer AA3110).

2.2.4. Control de calidad

Como control de calidad se utilizaron blancos y materiales certificados para suelos y plantas. Los mismos fueron preparados de la misma manera que las muestras y se midieron las concentraciones de metales mediante AAS cada 10 determinaciones de muestras problema. El material certificado utilizado para plantas fue "CTA-OTL-1" (hojas de tabaco oriental, Instituto de Química y Tecnología Nuclear), y el material certificado utilizado para suelos fue "CRM GBW07405" (Suelo-NRCCRM, China). Los porcentajes de recuperación para el material certificado de suelos fueron de 87 ± 3 % para Pb, 90 ± 1 % para Cu, 89 ± 3

% para Co, 93 ± 2 % para Ni, 94 ± 6 % para Fe, 90 ± 3 % para Zn, y 89 ± 4 % para Mn, estos son porcentajes promedio y sus desvíos estándar expresados con respecto al valor declarado y teniendo en cuenta todas las determinaciones realizadas en dicho material a lo largo de la tesis completa. Los porcentajes de recuperación para el material certificado vegetal fueron de 89 ± 4 % para Pb, 92 ± 1 % para Cu, 90 ± 1 % para Co, 91 ± 4 % para Ni, 90 ± 5 % para Fe, 91 ± 3 % para Zn, y 90 ± 2 % para Mn, estos son porcentajes promedio y sus desvíos estándar expresados con respecto al valor declarado y teniendo en cuenta todas las determinaciones realizadas en dicho material a lo largo de la tesis completa. Se encontró que los coeficientes de variación entre replicados fueron inferiores al 10%.

2.2.5 Análisis de datos

2.2.5.1 Análisis estadísticos

Se utilizó el test de Shapiro-Wilks para evaluar la distribución normal de los datos. No se encontraron variables con distribución no normal. Sin embargo, se presentó heteroscedasticidad en casi todos los casos. Esto se debe a que la respuesta de los distintos individuos de cada especie vegetal responden de manera variable a medida que están expuestos a concentraciones de Pb en suelo más elevadas. No obstante este problema fue resuelto mediante la incorporación de heteroscedasticidad en el modelo usando Infostat /E acoplado a R para realizar un análisis de varianza (ANOVA) y así determinar los efectos que tienen elevadas concentraciones de Pb en suelos sobre la concentración de Pb en las plantas. Cada vez que el ANOVA indicó efectos significativos ($p < 0,05$), se llevó a cabo una comparación por pares de medias mediante la prueba de Tukey.

2.2.5.2 Factores de translocación y bioacumulación en plantas

Se calcularon el factor de translocación (FT) y el factor de bioacumulación (FBC) utilizando la relación entre la concentración de Pb en raíces y parte aérea en el primer caso [$FT = C_{a\acute{e}rea} / C_{ra\acute{z}}$] y la relación entre la concentración Pb_{HCl} en los suelos y la concentración del metal en la parte aérea de las plantas [$FBC = C_{a\acute{e}rea} / C_{suelo}$] (Bu-Olayan y Thomas, 2009). Para obtener el dato de la concentración de Pb en la parte aérea de las plantas, la concentración medida en hojas y tallos se multiplicó por la biomasa total de cada

órgano. Estas masas de Pb se sumaron entre sí y el resultado se dividió por la biomasa total de los órganos aéreos (Salazar y Pignata, 2014):

$$C_{\text{aérea}} = (\text{BioM}_{\text{hoja}} \times C_{\text{hoja}} + \text{BioM}_{\text{tallo}} \times C_{\text{tallo}}) / (\text{BioM}_{\text{hoja}} + \text{BioM}_{\text{tallo}})$$

Donde: C significa concentración en la parte de la planta indicada en el subíndice; y BioM es la biomasa correspondiente a la parte de la planta indicada en el subíndice.

2.3. Resultados

2.3.1. Metales pesados en suelos

Las concentraciones de plomo para las fracciones pseudototal y extraíble con HCl 0,5M, y los valores de % MO, pH, EC para los diez sitios de muestreo se muestran en la Tabla 2.1.

De acuerdo con las directrices de calidad de suelos en la República Argentina y Canadá (Tabla 1.3, presentada en el Capítulo I), las concentraciones medias de Pb en la fracción pseudototal en los sitios de muestreo 1, 2, 3, 4, 5 y 6 superaron los límites para los usos agrícola, residencial e industrial del suelo. Los sitios de muestreo 7, 8, 9 y 10 mostraron valores dentro de estos límites. Sin embargo, la concentración de Pb en las fracciones pseudototal y extraíble con HCl fue significativamente más elevada en los sitios 7 y 8 comparados estos con los sitios 9 y 10.

Es importante señalar que el sitio de muestreo 3 fue elegido por la presencia de una pila de escorias depositadas en el lugar. Este sitio se corresponde con el presentado en la Tabla 1.4. (Capítulo I) y a pesar de que dicho sitio se encuentra a una distancia de 1260 m desde la fundición de plomo, mostró concentraciones de plomo tan elevadas como las de los sitios próximos a la fundición.

En los diez sitios estudiados, las concentraciones de Zn, Co, Cu, y Ni para la fracción pseudototal presentaron valores dentro de los límites legales [Zn: (34 ± 8) mg kg⁻¹; Co: (12 ± 5) mg kg⁻¹; Cu: (9 ± 4) mg kg⁻¹; Ni: (5 ± 2) mg kg⁻¹]; y no mostraron relación con la distancia a la fundición. Para el caso de Fe y Mn, no existen umbrales legales, sin embargo se puede decir que sus concentraciones en la fracción pseudototal estaban dentro de los

valores esperados para la región si se comparan con datos bibliográficos (Bermudez et al., 2010), [Mn: (435 ± 105) mg kg⁻¹ ; Fe: (10000 ± 2000) mg kg⁻¹].

Tabla 2.1. Valores medios y desvíos estándar (±DS) de la concentraciones de plomo (en mg kg⁻¹) para las fracciones pseudototal y extraíble con HCl 0,5M, porcentaje de materia orgánica (%MO), pH, y conductividad eléctrica (CE) (µs.cm⁻¹).

Sitio	Distancia*	Pb	Pb _{HCl}	%MO	pH	CE
1	80	10471±927	2671±489	5,5±0,7	4,7±0,2	332,5±34,2
2	140	2722±574	2429±289	5,8±0,6	6,6±0,2	107,1±27,7
3	1260	2026±1929	1592±1297	6,1±0,5	7,0±0,2	221,3±44,0
4	50	1391±118	1532±201	5,5±0,3	5,8±0,1	109,0±19,6
5	40	1187±241	1497±289	5,4±0,1	6,8±0,1	105,9±1,9
6	120	1059±307	641±183	5,4±0,3	6,9±0,1	404,7±41,5
7	268	76,0±2,5	56,5±2,3	10,0±0,3	6,6±0,2	215,3±27,5
8	580	17,5±4,5	19,1±3,0	10,5±0,8	6,3±0,2	142,7±16,4
9	5630	9,9±1,7	9,1±0,9	5,8±0,4	6,9±0,1	96,8±21,3
10	1230	9,7±2,4	8,8±1,2	7,3±0,5	6,9±0,2	138,9±32,6

* Distancia a la fundición en m

La concentración de Pb en las fracciones pseudototal y extraíble con HCl 0,5 M presentó valores por encima de los que fija la legislación y en el caso de la fracción extraíble las concentraciones fueron similares a las correspondientes en la fracción pseudototal en varios sitios (Tabla 2.1.). Las concentraciones extraíbles con HCl 0,5M para el resto de los elementos fueron: Zn: (9 ± 3) mg kg⁻¹; Co: (3,0 ± 0,5) mg kg⁻¹; Cu: (4 ± 1) mg kg⁻¹; Ni: (2,7 ± 1,1) mg kg⁻¹; Mn: (270 ± 50) mg kg⁻¹; Fe: (600 ± 200) mg kg⁻¹.

El porcentaje de materia orgánica estuvo entre el 5,4% y 10,5%. Si bien no se encontró una tendencia clara para esta variable, es notable que en los suelos más contaminados (sitios 1 a 6), el %MO fue significativamente menor en comparación con los otros sitios (7 a 10). El pH del suelo mostró valores ligeramente ácidos o cercanos a la neutralidad, excepto para los sitios 1 y 4 en los que se detectaron bajos valores de pH, correspondientes a condiciones ácidas. La conductividad eléctrica mostró resultados variables, sin que esta variabilidad se asociara a las fracciones pseudototal o extraíbles con HCl 0,5 M de los metales pesados estudiados.

2.3.2. Evaluación de la capacidad fitoextractiva de las especies nativas

En la Tabla 2.2. se exponen las familias a las que pertenecen las diez especies de plantas evaluadas, colectadas en el área de estudio, su status, su hábito, los sitios de muestreo en que fueron encontradas, y las concentraciones de Pb media, máxima y mínima (mg g^{-1} PS) cuantificadas en hojas. A fin de evaluar el potencial de las distintas especies para ser empleadas en fitorremediación de suelos, en esta etapa la concentración máxima de Pb en las hojas fue considerada la variable más significativa.

La concentración más alta de Pb en hojas se encontró en la especie nativa *Tagetes minuta* L. (396 mg g^{-1} PS), seguida por la especie nativa *Bidens pilosa* L. (111 mg g^{-1} PS).

Tabla 2.2. Especies vegetales estudiadas, colectadas en las inmediaciones de la fundición de Pb en Bouwer, provincia de Córdoba. Las concentraciones de plomo están expresadas en $\mu\text{g. g}^{-1}$ PS.

Especie	Familia	Estatus	Hábito	Sitios	Pb		
					Media	Mín	Máx
<i>Bidens pilosa</i> L.	Asteraceae	Nativa	Herbácea anual	1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10	26,6	5,2	111
<i>Tagetes minuta</i> L.	Asteraceae	Nativa	Herbácea anual	2, 5	157,6	8,6	396
<i>Solanum argentinum</i> Bitter & Lillio	Solanaceae	Nativa	Arbusto perenne	2, 5, 7, 8, 10	10,0	4,6	24,8
<i>Amaranthus</i> sp.	Amaranthaceae	Nativa	Herbácea anual	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	11,7	6,4	21,2
<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.	Poaceae	Introducida	Hierba perenne	5, 8, 10	3,4	1,7	5,9
<i>Ipomoea purpurea</i> (L.) Roth	Convolvulaceae	Nativa	Enredadera anual	5, 6, 8, 9, 10	10,1	3,1	27,9
<i>Mirabilis jalapa</i> L.	Nyctaginaceae	Adventicia	Hierba perenne	5, 9	18,4	9,5	27,3
<i>Aristolochia argentina</i> Griseb.	Aristolochiaceae	Nativa	Enredadera perenne	8	8,2	7,4	9,7
<i>Lippia turbinata</i> Griseb.	Verbenaceae	Nativa	Arbusto perenne	8	6,6	6,4	6,9
<i>Eupatorium inulifolium</i> Kunth	Asteraceae	Nativa	Arbusto perenne	1	30,7	30,2	31,1

2.3.3. Concentración de Plomo en plantas

En la Tabla 2.3. se presentan las concentraciones de Pb en hojas, tallos y raíces para cada especie colectada en el área de estudio. Además, se presentan los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) para la comparación entre las concentraciones de plomo medidas en las especies que se encontraron en más de un sitio.

B. pilosa se encontró en casi todos los sitios estudiados. Mostró concentraciones elevadas de Pb en raíces, principalmente en los sitios 1 ($741 \pm 64 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$) y 5 ($448 \pm 75 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$). La concentración de Pb en hojas también fue relativamente alta para esta especie en el sitio 5 ($101 \pm 9 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$) y en tallos en el sitio 9 ($99 \pm 2 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$). En cuanto a *T.minuta*, la especie sólo se encontró en los sitios de muestreo 2 y 5. Las hojas, tallos y raíces presentaron elevadas concentraciones de Pb en el sitio 5 ($380 \pm 22 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$, $72 \pm 2 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$ y $859 \pm 36 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$, respectivamente). La acumulación de Pb en el sitio 2 fue reducida, pese a que la concentración de Pb y Pb_{HCl} en el suelo de este sitio fue significativamente mayor a la del sitio 5.

El resto de las especies estudiadas no reveló concentraciones de Pb importantes en hojas para ningún sitio, lo que limita su uso en fitoextracción. Sin embargo, *Sorghum halepense* presentó una alta concentración de Pb en las raíces en el sitio 5 ($1407 \pm 64 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$). Esto indicaría que si bien esta especie no es apta para la fitoextracción de Pb ya que el metal no se transloca a los tejidos aéreos, puede ser útil para la inmovilización de Pb en el suelo. Esta técnica está incluida dentro de la tecnología de fitorremediación y se denomina fitoestabilización (Ghosh y Singh, 2005).

Tabla 2.3. Acumulación de Pb en hojas, tallos y raíces de plantas ($\mu\text{g g}^{-1}$), factor de translocación (FT) y de bioacumulación (FBC); resultados de ANOVA para la concentración de Pb en las especies encontradas en más de un sitio.

Especie		Sitios de Muestreo									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Bidens pilosa</i> L.	Hojas ^{***}	30,5±0,9 ^c	16,3±0,7 ^{ab}	14±1 ^{ab}	13±1 ^{ab}	100±9 ^d			9,1±0,9 ^a	24±1 ^{bc}	5,5±0,6 ^a
	Tallos ^{***}	29,3±0,9 ^e	22±3 ^c	23,2±0,3 ^{cd}	11,8±8 ^b	28±1 ^{de}			5,1±0,7 ^a	99±2 ^f	5,8±0,7 ^a
	Raíces ^{***}	741±64 ^c	131±3 ^a	140±5 ^a	44,7±0,6 ^a	448±75 ^b			3,9±0,1 ^a	2,7±0,6 ^a	2,6±0,4 ^a
	FT	0,04	0,15	0,13	0,28	0,14			1,82	22,6	2,19
	FBC	0,01	0,01	0,01	0,01	0,04			0,37	6,76	0,64
<i>Tagetes minuta</i> L.	Hojas ^{***}		9,0±0,4 ^a			380±22 ^b					
	Tallos ^{***}		11±1 ^a			72±2 ^b					
	Raíces ^{***}		30,7±0,5 ^a			859±36 ^b					
	FT		0,31			0,26					
	FBC		0,01			0,14					
<i>Solanum argentinum</i> Bitter & Lillio	Hojas ^{***}		8,2±0,2 ^c			24±1 ^d		6,8±0,4 ^b	6,2±0,2 ^b		5,1±0,4 ^a
	Tallos ^{***}		8,1±0,2 ^b			20±3 ^c		3,6±0,5 ^a	3,5±0,2 ^a		4,5±0,6 ^{ab}
	Raíces ^{***}		108±0,1 ^c			68±3 ^d		No detectable**	2,6±0,3 ^a		4,7±0,2 ^b
	FT		0,75			0,32			1,87		1,01
	FBC		0			0,01			0,25		0,54
<i>Amaranthus</i> sp.	Hojas ^{**}			6,6±0,3 ^a	13,5±0,7 ^{abc}	16,7±0,7 ^c	14,2±0,5 ^{bc}	9,5±0,3 ^{ab}	14±6 ^{abc}	10,3±0,5 ^{abc}	8,6±0,6 ^{ab}
	Tallos ^{***}			5,1±0,1 ^a	9±2 ^{bc}	9±1 ^{bc}	10,3±0,4 ^c	4,12±0,03 ^a	5,8±0,3 ^{ab}	7,4±0,1 ^{abc}	6,0±0,1 ^{ab}
	Raíces ^{***}			8±2 ^a	32,2±0,8 ^c	115±9 ^d	20,2±0,3 ^b	6,9±0,4 ^a	3,1±0,6 ^a	6±1 ^a	5,1±0,1 ^a
	FT			0,71	0,35	0,11	0,61	0,98	3,17	1,58	1,45
	FBC			0	0,01	0,01	0,02	0,12	0,51	0,97	0,83
<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.	Hojas ^{**}					5,2±0,6 ^b			2,8±0,5 ^a		2,1±0,6 ^a
	Tallos [*]					3,1±0,6 ^b			1,2±0,1 ^a		1,6±0,3 ^{ab}
	Raíces ^{***}					1407±64 ^b			4±1 ^a		2,2±0,4 ^a
	FT					0			0,54		0,85
	FBC					0			0,11		0,21

ns = no significativo - * Significativo con $p < 0,05$. - ** Significativo con $p < 0,01$. - *** Significativo con $p < 0,001$. ** No detectable: por debajo del límite de detección.

Tabla 2.3. (Continuación). Acumulación de Pb en hojas, tallos y raíces de plantas ($\mu\text{g g}^{-1}$), factor de translocación (FT) y de bioacumulación (FBC); resultados de ANOVA para la concentración de Pb en las especies encontradas en más de un sitio.

Especies		Sitios de Muestro									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Ipomoea purpurea</i> (L.) Roth	Hojas***					27,2±0,5 ^c	11,4±0,2 ^b		5±2 ^a	6,5±0,2 ^a	6±1 ^a
	Tallos**					22±1 ^a	8,2±0,2 ^a		60±17 ^b	6±1 ^a	5,4±0,5 ^a
	Raíces***					299±24 ^a	23±1 ^b		-	-	-
	FT					0,08	0,43				
	FBC					0,02	0,02				
<i>Mirabilis jalapa</i> L.	Hojas***					26,9±0,4 ^b				9,8±0,4 ^a	
	Tallos**					27±1 ^b				5,7±0,8 ^a	
	Raíces**					145±1 ^b				5,6±0,2 ^a	
	FT					0,19				1,38	
	FBC					0,02				0,85	
<i>Aristolochia argentina</i> Griseb.	Hojas								14±1		
	Tallos								3,2±0,2		
	Raíces								1,9±0,5		
	FT								3,62		
	FBC								0,6		
<i>Lippia turbinata</i> Griseb.	Hojas								6,6±0,3		
	Tallos								2,4±0,8		
	Raíces								2,0±0,1		
	FT								1,9		
	FBC								0,2		
<i>Eupatorium inulifolium</i> Kunth	Hojas	30,7±0,4									
	Tallos	21,5±0,9									
	Raíces	441±23									
	FT	0,23									
	FBC	0,1									

ns = no significativo - * Significativo con $p < 0,05$. - ** Significativo con $p < 0,01$. - *** Significativo con $p < 0,001$.

2.4. Discusión

2.4.1. Contenido de plomo en plantas

Es un hecho conocido que el contenido de plomo en las especies vegetales depende de diferentes factores ambientales (Blaylock y Huang, 2000; Blaylock et al., 1997). Todas las plantas absorben metales del suelo donde se encuentran pero en distinto grado, dependiendo de la especie vegetal, y de las características y contenido en metales del suelo. Las plantas pueden adoptar distintas estrategias frente a la presencia de metales en su entorno (Baker, 1981; Barceló et al., 2003). Unas basan su resistencia a los metales con la estrategia de una eficiente exclusión del metal, restringiendo su transporte a la parte aérea, otras acumulan el metal en la parte aérea en una forma no tóxica para la planta. La exclusión es característica de especies sensibles a los metales, mientras que la acumulación es común en especies que crecen en suelos contaminados o metalíferos.

Así mismo, se ha informado que el contenido de Pb en plantas que crecen en suelos no contaminados ronda por lo general entre 0,1 y 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS con un promedio de 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS (Kabata Pendias y Pendias, 1984; Palacios et al., 2002). La mayoría de los autores considera una concentración de plomo de 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS como criterio para establecer que una especie es hiperacumuladora de Pb, sin embargo este tipo de criterio mínimo nominal no es actualmente el único marco operativo práctico para reconocer especies hiperacumuladoras (van der Ent et al., 2013). Van der Ent et al. (2013) proponen dos criterios adicionales y alternos: (i) Una especie es hiperacumuladora cuando presenta concentraciones entre 2 y 3 órdenes de magnitud mayor que la mayoría de las plantas que crecen en suelos no contaminados, o (ii) Una especie es hiperacumuladora cuando presenta concentraciones al menos un orden de magnitud superior que la mayoría de las especies cuando crecen en suelos metalíferos. Teniendo estos criterios en cuenta, a pesar de no llegar a acumular 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS de Pb, *T. minuta* y *B. pilosa* mostraron valores que las hacen candidatas para nuevos estudios sobre sus capacidades como fitorremediadoras. *T. minuta* cumple el requisito (i) mientras que *B. pilosa* cumple el requisito (ii). Como señalaron van der Ent et al. (2013), el hallazgo de un ejemplar con elevada concentración de un metal que

cumpla con el requisito tradicional o con alguno de estos, debe ser reportado para que luego la especie sea confirmada como acumuladora en condiciones experimentales.

También es importante destacar que ambas especies son hierbas anuales de rápido crecimiento, características que se consideran óptimas para su empleo en fitorremediación (Blaylock et al., 1997). En la bibliografía se informan otras especies del género *Tagetes* y del género *Bidens* que han sido estudiadas como fitoextractoras de metales pesados de suelos (Bech et al., 2012; Wei et al., 2012; Sun et al., 2011). Sin embargo *T. minuta* y *B. pilosa* nunca habían sido reportadas para estos fines con anterioridad a este estudio.

La mayoría del resto de las especies estudiadas mostraron también concentraciones más altas que el promedio para plantas que crecen en suelos no contaminados, pero no en una medida suficiente como para cumplir los requisitos citados previamente. Esto indica que el plomo se transfirió a los tejidos vegetales pero que no se acumuló en concentraciones de interés para la utilización de las mismas en fitorremediación.

La acumulación de Pb encontrada para *T. minuta* y *B. pilosa* en nuestro estudio fue inferior a los valores reportados por otros autores en otras especies herbáceas, como Kabata-Pendias y Pendias (1984) en Polonia, y Palacios et al. (2002) en España, donde el contenido de Pb en órganos aéreos alcanzó 2700 y 4100 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS. Sin embargo, en esos trabajos no queda claro si el Pb provenía de la deposición aérea por emisión directa de la fuente o desde el suelo, ya que las fundiciones de plomo cuyos efectos se estudiaron, estaban operando durante la investigación y está demostrado que la acumulación a través de las hojas por presencia de fuentes atmosféricas es mayor a la que proviene de la translocación de Pb por absorción desde el suelo a los tejidos aéreos. Esta última es normalmente baja en la mayoría de las especies vegetales (Huang y Cunningham, 1996). En contraste, en nuestro estudio la única fuente de Pb fue el contenido en suelos ya que la fundición de plomo dejó de operar muchos años atrás.

Si bien en esta investigación la concentración absoluta de Pb en los tejidos de las distintas especies de plantas analizadas fue un tema central, también se calcularon los factores de translocación (FT) y de bioacumulación (FBC), como criterios que permiten establecer la eficiencia en la extracción de plomo del suelo por especies de plantas fitorremediadoras. En la Tabla 2.3. se muestran los FT y FBC para cada especie en cada

sitio. En los resultados, $FT > 1$ indica que la especie transloca efectivamente metales desde la raíz a la parte aérea; $FBC > 10$ indica especies hiperacumuladoras, $FBC > 1$ indica especies acumuladoras y $FBC < 1$ indica especies excluidoras (Bu-Olayan y Thomas, 2009). En consecuencia, casi todas las especies estudiadas se comportan como translocadoras eficaces de Pb cuando los suelos presentaron concentraciones de plomo comprendidas entre 8 y 20 mg kg⁻¹ PS en la fracción extraíble con HCl 0,5M ($TF > 1$ en los sitios 8, 9 y 10). Esto también se observa en la Tabla 2.3., principalmente para *Bidens pilosa*, destacándose que en los sitios 8, 9 y 10 las concentraciones en órganos aéreos supera ampliamente la concentración en raíz, mientras que en los sitios 1, 2, 3, 4, y 5 ocurre lo contrario.

Teniendo en cuenta el FBC, la mayoría de las especies presentan los valores más altos en sitios con bajas concentraciones de plomo en suelos (FBC en 8, 9 y 10 $>$ FBC en 1 y 5), y ninguna de las especies estudiadas se comportó como hiperacumuladora. Algunas de ellas se comportaron como acumuladoras y la mayoría fueron especies excluidoras de plomo. Las elevadas capacidades de translocación y acumulación observadas en los sitios 8, 9 y 10 para todas las especies en general, se vieron limitadas por el aumento del contenido de Pb en suelo en los demás sitios. Frente a altas concentraciones de este metal en suelo las especies pasan a comportarse como excluidoras de plomo. El caso más marcado es el de *Sorghum halepense*, especie que puede ser tipificada como fitoestabilizadora debido a la alta tolerancia demostrada en este estudio y a los elevados niveles de plomo que acumula en sus raíces. Esta especie puede contribuir a inmovilizar al metal en el suelo previniendo la consecuente transferencia a alimentos. Este es un resultado importante y como fue señalado por Närhi et al. (2012) el reconocimiento de las especies de plantas que toleran elevadas concentraciones de elementos tóxicos es esencial para ser empleadas en la fitoestabilización de los mismos.

Ninguna de las especies estudiadas se ajusta a los criterios clásicos definidos en la bibliografía para su empleo en fitorremediación de suelos contaminados. Como tendencia general, para la mayoría de ellas en los sitios de muestreo estudiados, las concentraciones de Pb fueron mayores en las raíces que en los tejidos aéreos, presentando FT y FBC relativamente bajos. Como han señalado Blaylock y Huang (2000), las raíces son la principal barrera para la translocación de plomo desde el suelo a la planta, es por eso que hay pocas especies conocidas como hiperacumuladoras de plomo, un metal bastante tóxico

para la mayoría de las plantas. Es importante destacar que el Pb es, por este motivo, un elemento que difícilmente se acumula en órganos aéreos, y las estrategias de fitorremediación de suelos contaminados con este metal incluyen tanto especies hiperacumuladoras como acumuladoras que proporcionen no solo el servicio ecológico de remediación del suelo sino que paralelamente también permiten obtener productos de interés económico durante el proceso de remediación (Danh et al., 2010). En este sentido, entre las características óptimas de *T. minuta* se encuentran, además de ser acumuladora de plomo, la rápida adaptación a hábitats perturbados y la producción de aceites esenciales (Batish et al., 2007; Serrato Cruz, 2003; Gil et al., 2000). La ausencia de plomo en el aceite esencial debe ser demostrada antes de proponer a esta especie como fitorremediadora y productora simultáneamente. El aceite esencial de *T. minuta* se utiliza como fijador de fragancias y como materia prima en perfumería (Soule, 1993). Además, *T. minuta* produce flavonoides reportados en el uso contra microorganismos no deseados (Amat, 1983; Tereschuk et al., 1997) y para inhibición de enzimas, como antioxidantes y citotóxicos (Middleton y Kandaswami, 1993). También, el aceite esencial de *T. minuta* posee la capacidad de suprimir malezas y se puede utilizar como herbicida natural (Batish et al., 2007).

2.4.2. Relación entre las propiedades del suelo y la acumulación de plomo en las especies estudiadas

La mayoría de las especies analizadas presentaron la tendencia de disminuir la acumulación de plomo en tejidos aéreos cuando las plantas crecen en sitios con menos contenido de Pb en suelos. Sin embargo, el sitio 5 rompió esta tendencia, ya que si bien el contenido de Pb_{HCl} en muestras de suelo de los sitios 3, 4 y 5 no mostró diferencias significativas (Tabla 2.1.) la acumulación de Pb en todas las especies fue significativamente mayor en el sitio 5 (Tabla 2.3.).

Este comportamiento sugiere la presencia de factores que influyen sobre las tasas de absorción y acumulación en el sitio 5, tanto para *T. minuta* como para *B. pilosa*. Teniendo en cuenta las propiedades físico-químicas del suelo, el contenido de materia orgánica podría estar relacionado con la movilidad del plomo en los suelos, pero esta variable, por sí misma, no logra explicar las diferencias encontradas en la captación de Pb por las plantas.

La conductividad eléctrica y el pH de los suelos superficiales estudiados no se relacionaron con la concentración de Pb_{HCl} en suelo y tampoco explicaron claramente la acumulación de Pb por las plantas. El pH ácido suele estar relacionado con la biodisponibilidad de metales pesados (Sutherland y Tolosa, 2001), sin embargo la mayoría de las especies estudiadas no acumularon grandes cantidades de Pb a pesar de la acidez observada en los suelos donde crecían. Por otra parte, en los dos sitios con acidez fuerte se encontraron evidencias de residuos de la trituración de baterías, por lo que la acidez encontrada podría estar relacionada con los componentes ácidos de las baterías y con compuestos ajenos a la biología del suelo, tóxicos para las plantas. Esta podría ser la causa por la que la absorción de Pb en estos sitios no fue elevada en relación con los sitios que presentaron valores de pH neutros o ligeramente ácidos. Resumiendo, las propiedades físico-químicas del suelo no se asociaron significativamente con la absorción y acumulación de plomo por parte de las plantas.

Una posible explicación para este comportamiento podría ser la disponibilidad de otros metales que provoquen fenómenos de competencia. En la Figura 2.2. se muestra la concentración de Cu y Zn en los suelos superficiales de los sitios de muestreo 1 a 6, donde la concentración de Pb fue elevada. También muestra la comparación por ANOVA entre los sitios para cada metal. El sitio de muestreo 5 presentó una concentración de Zn significativamente menor que los sitios 1, 2 y 6; y una concentración de Cu significativamente menor a la de los sitios 1, 6 y 4. Es decir que el sitio 5 en comparación a los demás sitios presenta o una menor disponibilidad de Cu, o una menor disponibilidad de Zn; por lo que en dicho punto estos metales no podrían competir con Pb en la medida en que lo hacen en los otros puntos.

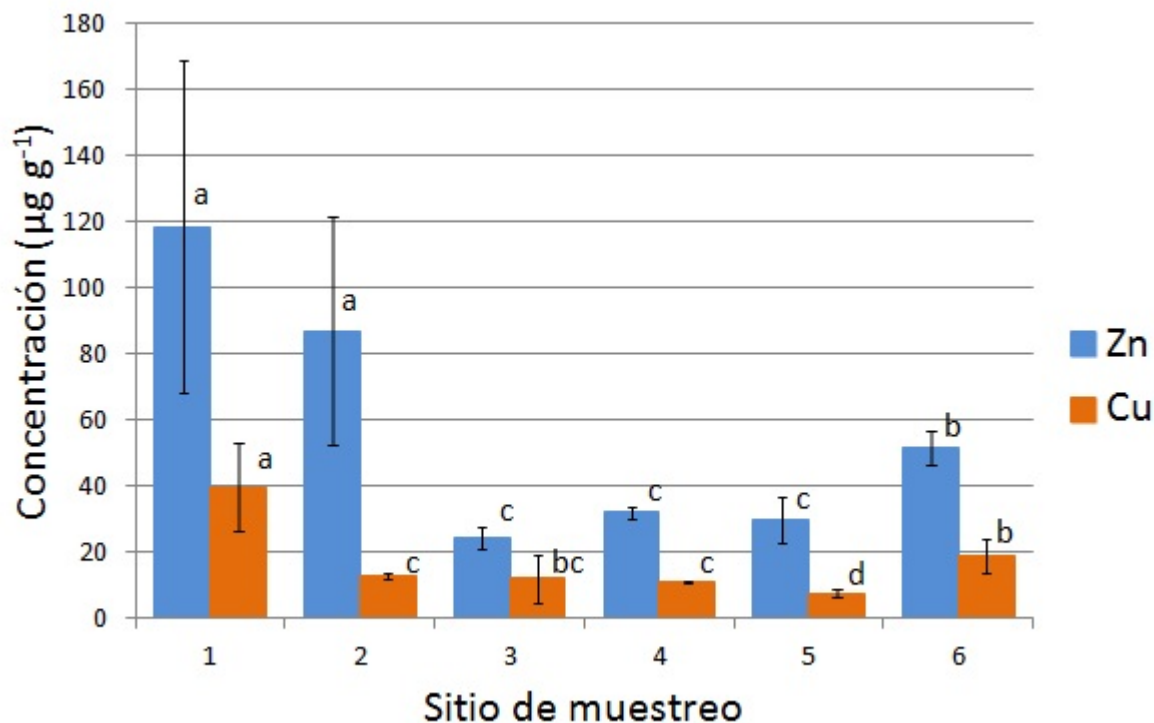


Figura 2.2. Concentración de Cu y Zn en suelos superficiales y resultados de ANOVA y comparación de medias.

2.5. Conclusión

Los resultados obtenidos en esta etapa de investigación “in situ” demostraron que las especies tolerantes nativas que crecen en suelos contaminados con plomo sufren una reducción en los factores de translocación y bioacumulación, a pesar de que las plantas acumulan más este metal cuando las concentraciones en suelo son mayores. Este fenómeno implica un cambio de estrategia desde la hiperacumulación o acumulación a la exclusión. Sin embargo, algunas especies conservan la capacidad de acumular cantidades significativas de Pb en las condiciones de concentraciones elevadas en el suelo. *T. minuta* y *B. pilosa*, mostraron tolerancia al metal y altas tasas de acumulación por lo que presentan características adecuadas para ser empleadas en la fitorremediación de suelos contaminados con plomo mediante la técnica de fitoextracción. Por su parte *S. halepense* acumula grandes cantidades de Pb en la raíz sin poder translocarlo a la parte aérea, por lo que presenta características adecuadas para ser empleadas en la fitorremediación de suelos contaminados con plomo mediante la técnica de fitoestabilización.

3. Capítulo III.

Tolerancia y acumulación de Pb en
Tagetes minuta L. y *Bidens pilosa* L.
Determinación del tiempo óptimo de
cultivo.

Resumen

En un primer estudio observacional a campo se encontraron concentraciones de plomo en tejidos aéreos de *T. minuta* y *B. pilosa* que sugirieron que ambas son especies aptas para ser empleadas en la fitorremediación de suelos contaminados con este metal. El estudio de este comportamiento en condiciones experimentales controladas era necesario para determinar los factores que potencian la acumulación y translocación del metal. De esta manera, este capítulo consistió en una primera instancia experimental de la tesis en la que se estudiaron las tasas de acumulación de Pb en los distintos órganos (raíz, tallo y hoja) de ambas especies y su variación a lo largo del desarrollo de las plantas, estableciéndose el tiempo óptimo y las condiciones de cultivo para cada una de ellas. Ésta respuesta fue estudiada enriqueciendo el suelo con plomo para alcanzar concentraciones crecientes del metal mediante el agregado de nitrato de plomo [Pb (NO₃)₂].

En este estudio *Bidens pilosa* y *Tagetes minuta* mostraron una gran tolerancia a elevadas concentraciones de plomo en suelo, satisfaciendo ampliamente este requisito para su empleo en fitorremediación. Para estas especies se determinó un tiempo óptimo de cultivo de 2 meses, y si bien los factores de translocación no fueron muy elevados, cabe destacar que el factor de translocación raíz-tallo (FT R-T) se mantuvo relativamente constante a lo largo del tiempo y para los diferentes niveles de concentración de plomo en suelo. *Bidens pilosa* mostró mayor eficiencia fitoextractora de Pb que *Tagetes minuta*, principalmente en suelos con elevada concentración del metal (600 mg kg⁻¹ PS).

3.1. Introducción

La aplicabilidad de técnicas de fitorremediación, como se explicó anteriormente, depende del profundo conocimiento del comportamiento de las especies vegetales y de las condiciones adecuadas de cultivo en cada situación. Entre estas condiciones, las más destacables son la capacidad de la planta para tolerar elevados niveles del contaminante que se desea extraer del suelo, la habilidad para absorberlo incorporándolo a sus tejidos, la producción de biomasa, el efecto del clima y la estacionalidad sobre la fisiología de la especie, la biodisponibilidad del metal en el suelo y los fenómenos de competencia que los

diferentes iones metálicos pueden presentar en relación con la especie empleada en fitorremediación (Ghosh y Singh, 2005; Montes Botella, 2001). El conocimiento de estas condiciones frecuentemente supone un cierto grado de dificultad ya que no pueden controlarse todas las variables simultáneamente. Muchos de estos problemas, sin embargo, se pueden evitar si se realizan estudios experimentales con el objetivo de realizar una adecuada selección tanto de las especies como de las condiciones de cultivo de las mismas, en condiciones óptimas de trabajo, considerando los factores mencionados.

Existen numerosos antecedentes sobre fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados como Cu, Zn, Cd y Ni, entre otros (Ahmed et al., 2012; Baltazar y Surisadai, 2012). Sin embargo, en el caso particular de suelos contaminados con Pb, la bibliografía señala una imposibilidad generalizada en la translocación de este metal hacia la parte aérea de la mayoría de las plantas debido a su toxicidad, lo cual dificulta la implementación de la fitoextracción de Pb de suelos contaminados (Baker, 1981; Pourrut et al., 2011). Es por eso que el hallazgo de especies vegetales que transloquen Pb representa un aporte importante al estudio del mejoramiento de las técnicas de fitorremediación que permitan extraer este metal, uno de los más importantes contaminantes de suelos debido a su elevada toxicidad y efectos adversos sobre salud humana (Kabata-Pendias y Mukherjee, 2007). Algunas de las especies que han sido estudiadas por su capacidad para extear el metal de suelos son:

- *Sorghum bicolor* y *Chrysopogon zizanioides*: mostraron capacidad para acumular Pb en concentraciones cercanas a $300 \mu\text{g g}^{-1}$ en tejidos aéreos al crecer en suelos contaminados; valor que se incrementó hasta $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ utilizando quelantes (Freitas et al., 2013).
- *Brassica juncea*: especie reportada numerosas veces en la bibliografía, con valores de acumulación de Pb en la parte aérea de hasta $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ PS cuando se cultiva en condiciones hidropónicas, pero que no superan los $100 \mu\text{g g}^{-1}$ PS cuando se la cultiva en suelos contaminados con el metal (Tangahu et al., 2011).
- *Thlaspi praecox*: se informan concentraciones de Pb en parte aérea cercanas a $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ PS, mientras que los valores de concentración en raíz alcanzan los $3000 \mu\text{g g}^{-1}$ PS, no obstante estos resultados fueron hallados cuando la especie se encontraba en suelos con una concentración de plomo de $30000 \mu\text{g g}^{-1}$ PS, con lo

cual el factor de bioacumulación fue inferior a 1, lo cual no permitiría clasificarla como especie recomendable en fitorremediación de suelos contaminados con este metal si se consideran los exigentes y poco realistas criterios de hiperacumulación (Vogel-Mikuš et al., 2005).

- *Bidens triplinervia*: especie que fue estudiada en suelos contaminados con Pb, con una concentración en tejidos aéreos de $600 \mu\text{g g}^{-1}$ PS, mientras que los valores hallados en las raíces superaron los $4000 \mu\text{g g}^{-1}$ PS (Bech et al., 2012).

- *Tagetes patula*: si bien esta especie se destaca principalmente como acumuladora de Cd, se ha demostrado que puede acumular también Pb en tejidos aéreos hasta alcanzar una concentración de $120 \mu\text{g g}^{-1}$ PS (Sun et al., 2011).

Estos antecedentes muestran que los valores hallados para *T. minuta* y *B. pilosa* son significativos para un primer estudio observacional a campo, y que el estudio de las mismas en condiciones experimentales controladas permitiría determinar los factores que potencien la acumulación y translocación del metal en estas especies. De esta manera, en este capítulo nos planteamos estudiar las tasas de acumulación y extracción de estas especies en diferentes condiciones de cultivo con suelos contaminados, con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de cultivo en que estas especies podrían ser empleadas para la fitoextracción de dicho metal. Particularmente en este capítulo se estudió la tasa de acumulación de Pb en los distintos órganos (raíz, tallo y hoja) de ambas especies y su variación a lo largo del desarrollo de las plantas a fin de determinar el tiempo óptimo de cultivo, esperando encontrar un patrón en la tasa de acumulación y de extracción neta del metal que se relacione con el estadio de desarrollo de la planta y los procesos fisiológicos que ocurren en cada etapa. De esto se desprende como predicción que durante el crecimiento de la planta puede ocurrir el mayor ingreso del metal, ya que durante ese período la planta toma la mayor cantidad de nutrientes y también realiza el mayor consumo de agua arrastrando el metal desde el suelo a la planta, luego durante el estadio reproductivo ocurre la redistribución de nutrientes en la planta y esto podría traer aparejado una relocalización del metal en diferentes órganos (Lassat, 2000; Crowley et al., 1991). También se estudió esta respuesta cuando el suelo fue adicionado con nitrato de plomo [$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$], a fin de establecer un gradiente de concentraciones de plomo en el mismo;

esperando encontrar una concentración a partir de la cual las plantas no puedan sobrevivir y no sean útiles para casos con dicho nivel de Pb en suelo.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Obtención de los suelos

Los suelos utilizados en esta experiencia fueron obtenidos de un área rural cercana a Bouwer distante de fuentes industriales de contaminación. Este sitio fue categorizado en el Capítulo I como “Control interno”, sus características y composición química pueden observarse en las Tablas 1.1. y 1.2. Para su recolección se removieron manualmente la cobertura vegetal y los objetos extraños de la superficie. Utilizando pala de acero inoxidable se recolectó suelo superficial (hasta 15 cm de profundidad), y se lo almacenó en bolsas plásticas. Luego se procedió al tamizado a 2 mm mediante tamices con malla no metálica y a la homogeneización del mismo. Este suelo fue fraccionado en cuatro partes iguales. Una parte se conservó sin modificaciones para ser utilizada en el tratamiento control. Las otras tres partes fueron enriquecidas con Pb (NO₃)₂ para alcanzar concentraciones de 300, 600 y 1200 mg kg⁻¹ PS de Pb, y ser empleado en el resto de los tratamientos. Estas concentraciones fueron verificadas tomando muestras aleatorias y procesándolas para medir metales pesados en ellas del mismo modo que se describió en el Capítulo I para la fracción pseudototal encontrándose los siguientes valores de Pb: Tratamiento control: 11,4 ± 0,9 mg kg⁻¹ PS; Tratamiento 300 mg kg⁻¹ PS: 251 ± 13 mg kg⁻¹ PS; Tratamiento 600 mg kg⁻¹ PS: 576 ± 39 mg kg⁻¹ PS; y Tratamiento 1200 mg kg⁻¹ PS: 1120 ± 109 mg kg⁻¹ PS.

3.2.2. Obtención del material vegetal

Semillas de *B. pilosa* y *T. minuta* fueron recolectadas en el predio donde había funcionado la fundición de plomo en la localidad de Bouwer. Las mismas se sometieron a un proceso de imbibición en agua durante 24 horas con el propósito de inducir la germinación y asegurar que la misma ocurra simultáneamente en la mayor cantidad de semillas posible. Luego fueron esterilizadas con NaClO al 1% V/V mediante agitación

manual durante 10 min, y posteriormente se lavaron con agua destilada. Las semillas germinaron en papeles de filtro humedecidos con agua destilada (4 días en oscuridad) y una vez que las plántulas tuvieron al menos un par de hojas verdaderas, se trasladaron a macetas con suelos preparados según cada tratamiento.

3.2.3. Diseño experimental

Se prepararon 3 macetas (réplicas) con 4 kg de suelo cada una y con 15 individuos de cada especie para cada concentración de Pb en suelo. De esta manera se obtuvo un total de 24 macetas. Semanalmente se midió la altura de cada planta y se contó el número de nudos a fin de evaluar la tasa de crecimiento; también se realizó un conteo semanal de individuos para determinar la tasa de supervivencia. Cuando se cumplieron 35 días desde el trasplante, se recolectaron 4 individuos al azar de cada maceta que formaron un pool. Este procedimiento se repitió a los 65 y 98 días. En cada una de las tres cosechas se procedió a la separación en raíz, tallo y hojas (añadiéndose la categoría de hojas senescentes en la última cosecha). Estas muestras fueron lavadas con agua milli-Q y luego se llevaron a estufa hasta obtener peso seco constante. Se determinó la biomasa seca producida por planta y por órgano. Las muestras fueron trituradas en molinillo eléctrico de acero inoxidable y luego fueron conservadas en bolsas plásticas herméticas hasta su análisis.

3.2.4. Determinación de la concentración de Pb en órganos vegetales

Las concentraciones de Pb en los órganos de las plantas se determinaron utilizando una extracción con una mezcla de ácido clorhídrico al 20% y ácido nítrico puro 3:1 V/V, cada muestra se analizó por triplicado (Bermudez et al., 2009). En primer lugar, 3 g PS de cada órgano por separado (hojas, tallos y raíces) se llevaron a mufla a 450 °C durante cuatro horas. Luego, se agregó la solución de extracción preparada mediante la mezcla de 7,5 mL de HCl al 20% y 2,5 mL de HNO₃ puro, ambos de grado analítico, la que se agregó a las cenizas resultantes del proceso anterior. Después de 4 h en reposo, la solución se filtró con papel de filtro (Munktell, Alemania) y se analizó usando un espectrómetro de absorción atómica de llama (FAAS, Perkin-Elmer AA3110) para medir la concentración de Pb.

3.2.5. Control de calidad

Como control de calidad se utilizaron blancos y materiales certificados, los que fueron tratados de la misma manera que las muestras y se midieron cada 10 determinaciones. El material certificado utilizado fue "CTA-OTL-1" (hojas de tabaco oriental, Instituto de Química y Tecnología Nuclear, OIEA). Los porcentajes de recuperación para el material certificado vegetal fueron de 89 ± 4 % para Pb, 92 ± 1 % para Cu, 90 ± 1 % para Co, 91 ± 4 % para Ni, 90 ± 5 % para Fe, 91 ± 3 % para Zn, y 90 ± 2 % para Mn, estos son porcentajes promedio y sus desvíos estándar expresados con respecto al valor declarado y teniendo en cuenta todas las determinaciones realizadas en dicho material a lo largo de la tesis completa.. Se encontró que los coeficientes de variación de los análisis entre replicados fueron inferiores al 10%.

3.2.6. Análisis de datos

3.2.6.1. Análisis estadísticos

Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilks para evaluar la distribución normal de las variables. No se encontraron elementos con distribución no normal. Sin embargo se detectó heteroscedasticidad. Esto se debe a que la respuesta de los distintos individuos de cada especie vegetal respondieron de manera variable a medida que fueron expuestos a concentraciones de Pb en suelo cada vez más elevadas. No obstante este problema fue resuelto mediante la incorporación de la heteroscedasticidad en el modelo usando Infostat /E acoplado a R para realizar un análisis de varianza (ANOVA). Cada vez que el ANOVA indicó diferencias significativas ($p < 0,05$), se llevó a cabo una comparación por pares de medias mediante la prueba de Tukey.

3.2.6.2. Factores de translocación y extracción total

Se calculó el factor de translocación desde raíz a tallo (FT R-T), desde tallo a hoja (FT T-H) y desde raíz a la parte aérea (FT R-A) utilizando la relación entre las concentraciones de Pb en raíces y tallo [$FT\ R-T = C_{\text{tallo}} / C_{\text{raíz}}$], las de Pb en tallos y hojas [$FT\ T-H = C_{\text{hoja}} / C_{\text{tallo}}$], y las de Pb en raíces y parte aérea [$FT\ R-A = C_{\text{aérea}} / C_{\text{raíz}}$], respectivamente (Bulayan y Thomas, 2009). Para obtener el dato de la concentración de Pb en la parte aérea

de las plantas, la concentración medida en hojas y tallos se multiplicó por la biomasa total de cada órgano. Estas masas de Pb se sumaron entre sí y el resultado se dividió por la biomasa total de los órganos aéreos (Salazar y Pignata, 2014):

$$C_{\text{aérea}} = (\text{BioM}_{\text{hoja}} \times C_{\text{hoja}} + \text{BioM}_{\text{tallo}} \times C_{\text{tallo}}) / (\text{BioM}_{\text{hoja}} + \text{BioM}_{\text{tallo}})$$

Donde: C significa concentración en la parte de la planta indicada en el subíndice; y BioM es la biomasa correspondiente a la parte de la planta indicada en el subíndice.

A fin de obtener el valor de extracción total por órgano y por planta, se multiplicó la concentración de Pb encontrada en cada órgano por la biomasa seca producida por planta para cada órgano.

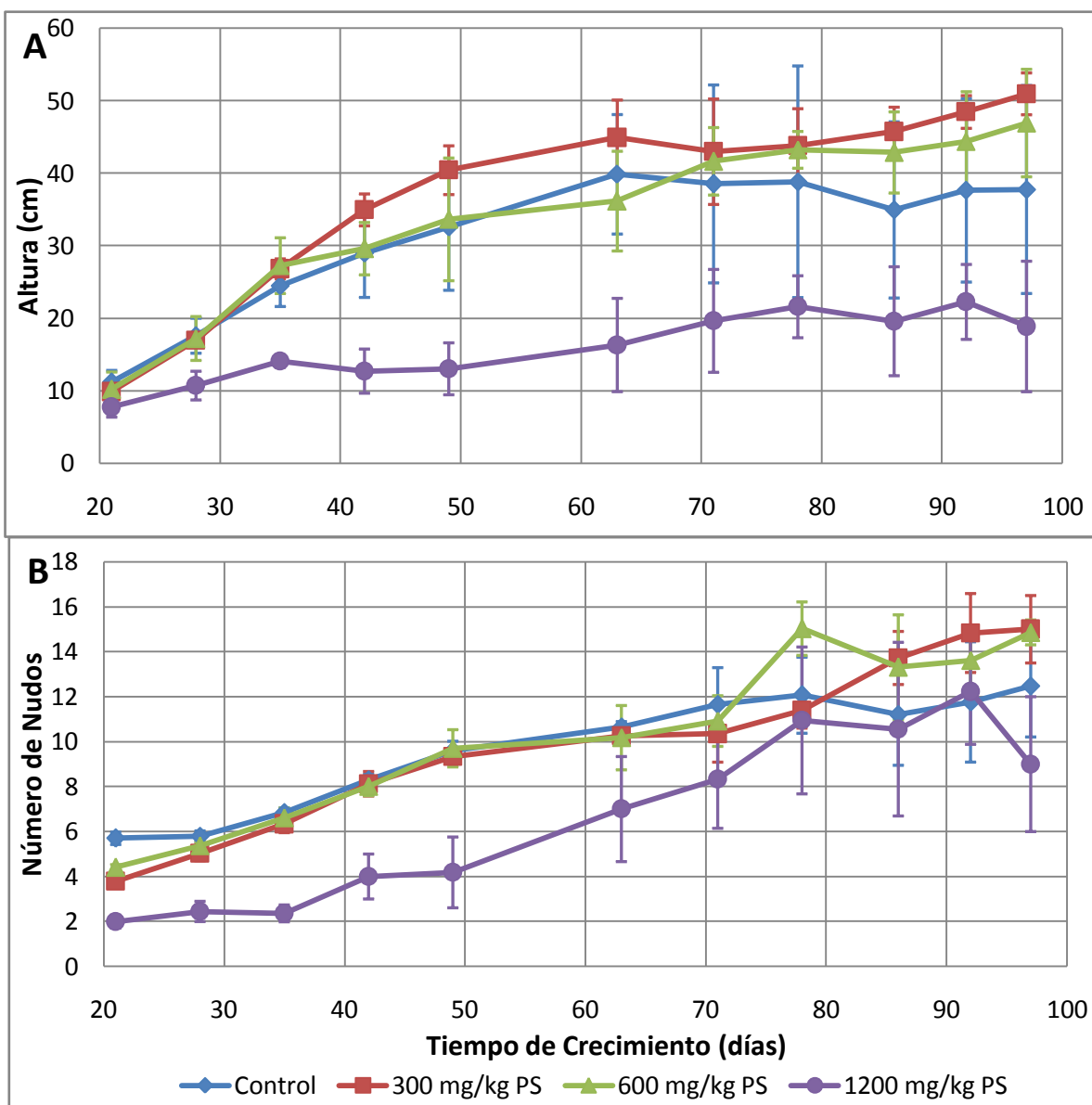
3.3. Resultados

3.3.1. *Tagetes minuta*

3.3.1.1. Crecimiento

En la Figura 3.1. se presentan las curvas de crecimiento de *T. minuta* tanto para altura (A) como para número de nudos (B), en cada tratamiento. Puede observarse que esta especie mostró un mayor crecimiento en altura para en los tratamientos con 300 y 600 mg kg⁻¹ PS de Pb en suelo que para el tratamiento control. No obstante, cuando las concentraciones en suelo fueron muy elevadas (1200 mg kg⁻¹ PS), el desarrollo de la especie se vio comprometido. Cabe destacar, sin embargo, que las plantas detuvieron su crecimiento alrededor de los 60 días para todos los tratamientos. Con respecto al número de nudos, el incremento de éstos fue progresivo hasta la finalización del experimento, por lo que a pesar de no haberse registrado un crecimiento en altura a partir de los 60 días, continuó el desarrollo de biomasa.

Figura 3.1. Crecimiento en A) altura y B) número de nudos de *Tagetes minuta* en presencia de concentraciones crecientes de Pb.

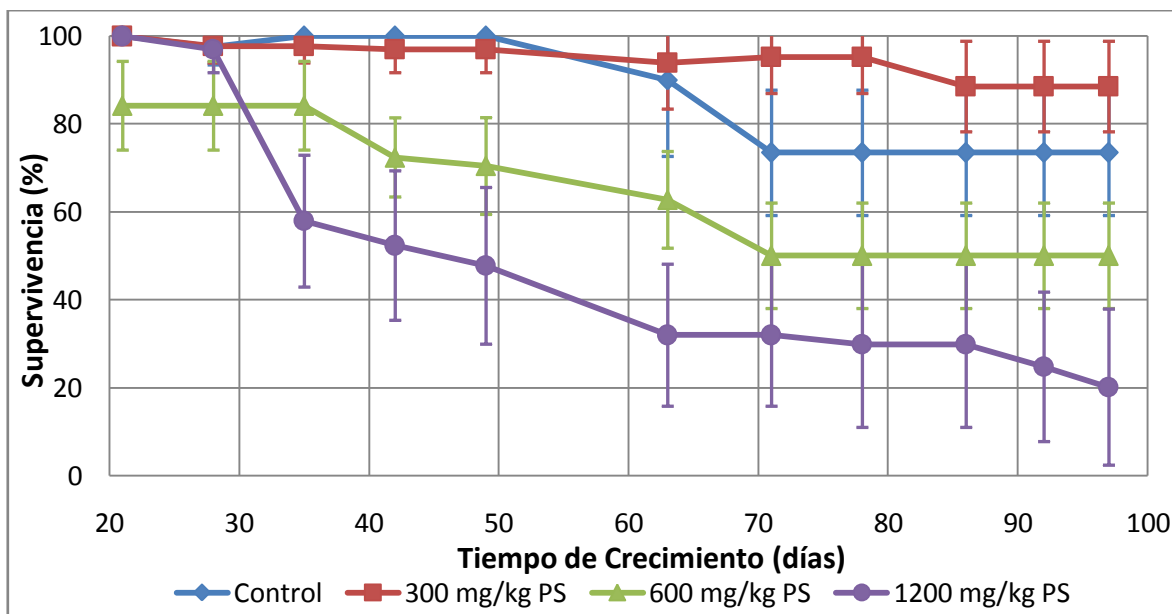


3.3.1.2. Supervivencia

En la Figura 3.2. se muestran los resultados para la supervivencia de *T. minuta* en cada tratamiento con concentraciones crecientes de plomo en suelo. El tratamiento control y el de 300 mg kg⁻¹ PS de Pb en suelo presentaron elevadas tasas de supervivencia, constantes a lo largo de todo el tiempo que duró el experimento con valores similares entre sí. Los porcentajes de supervivencia en tratamientos con mayores concentraciones de plomo en suelo fueron reducidos, sobre todo después de los 30 días de cultivo para la máxima

concentración. No obstante, cabe destacar que durante los primeros 50 días se puede trabajar incluso con 1200 mg kg^{-1} PS de Pb en suelo, lo que aseguraría la supervivencia del 50% de los individuos.

Figura 3.2. Supervivencia (%) de *T. minuta* a concentraciones crecientes de Pb en suelo.

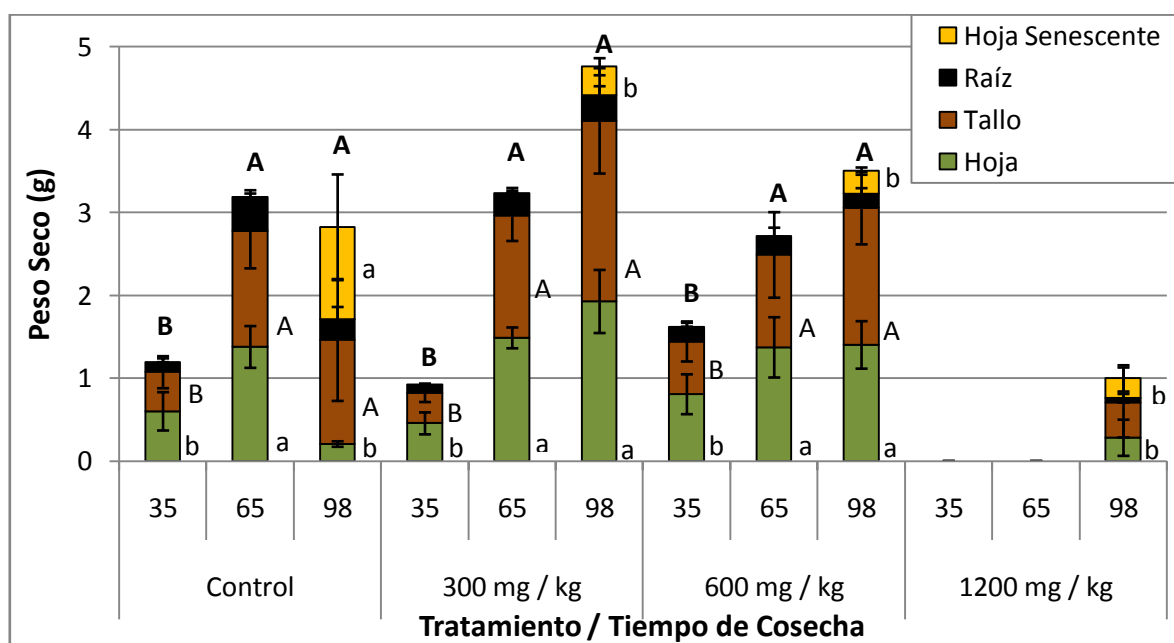


3.3.1.3. Producción de biomasa

La biomasa seca producida por planta y por órgano en cultivos de *T. minuta* para los distintos tratamientos se expone en la Figura 3.3. El tratamiento con 1200 mg kg^{-1} PS de Pb en suelo, debido a que presentó una supervivencia reducida, nos obligó a realizar una sola cosecha al finalizar el experimento. El análisis de la varianza (ANOVA) fue realizado para la biomasa seca total por planta, indicándose el resultado con letras en negritas sobre cada barra. Dentro de cada tratamiento se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la biomasa producida en las distintas instancias de desarrollo, y el incremento fue importante al pasar de la primera a la segunda cosecha, pero no cambió significativamente en la tercera. También es destacable que considerando un mismo momento de cosecha, la producción de biomasa seca no mostró diferencias significativas a medida que aumentaba el contenido de metal en el suelo.

En la comparación de la biomasa seca producida por cada órgano (Figura 3.3.) se observó una interacción estadística entre los factores “tiempo de cultivo” y “tratamiento” representando este último la concentración de Pb en el suelo, por lo que los factores no pudieron ser analizados por separado. El resultado de este ANOVA, indicado con letras minúsculas a la derecha de cada barra correspondiente al órgano hoja, mostró que la biomasa foliar depende principalmente del tiempo de cultivo, ya que todos los pesos registrados en la primera cosecha fueron significativamente inferiores a los de las cosechas subsiguientes, siendo estos iguales entre sí. Solo se vio reducida la biomasa foliar en el tiempo en el tratamiento control, y queda claro que esto se debió a un proceso de senescencia temprana experimentado por las plantas en este tratamiento (mayor que en los demás).

Figura 3.3. Producción de biomasa seca por planta y por órgano en la especie *T. minuta* en distintos momentos de su desarrollo, a concentraciones crecientes de Pb en suelo.



Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$. Las letras minúsculas se utilizaron para los casos en los que se encontró interacción estadística entre los factores “tratamiento” y “tiempo de cultivo”. Las letras mayúsculas comparan la biomasa producida a distintos tiempos de cosecha, dentro de cada tratamiento de Pb en suelo. Las letras se ubican a la derecha de cada órgano analizado, sobre cada barra se colocan letras negras que comparan la biomasa total por planta.

Para tallos no se encontró interacción estadística entre los factores, tampoco se apreciaron diferencias significativas entre los tratamientos con distintas concentraciones de plomo en suelo. Con respecto al tiempo de cultivo, la biomasa de los tallos se incrementó

significativamente entre la primera y segunda cosecha para luego permanecer constante hacia la tercera.

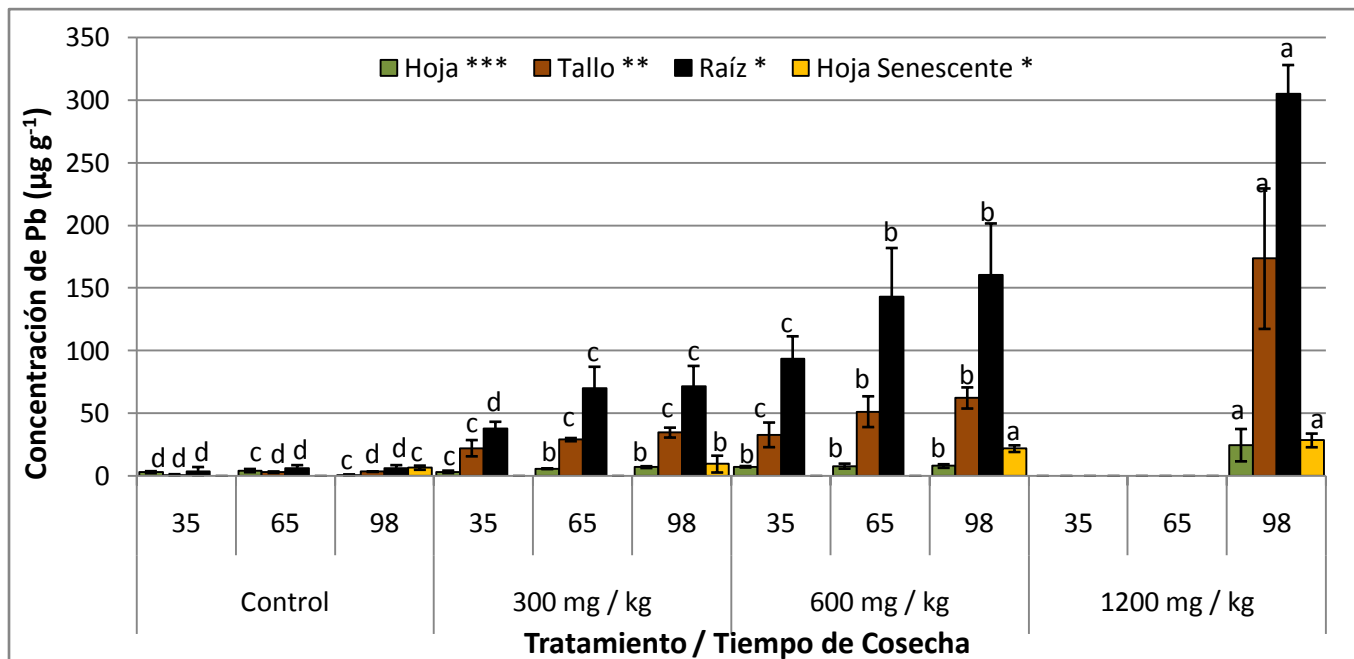
La biomasa radical no fue significativamente afectada por el contenido de Pb en suelo ni por el tiempo de cultivo. Esto muestra que esta especie desarrolla rápidamente su raíz sin que el proceso se vea afectado por las condiciones adversas generadas por elevadas concentraciones de plomo en el suelo.

3.3.1.4. Acumulación de Pb en raíz, tallo y hojas

En la Figura 3.4. se pueden observar las concentraciones de Pb medidas en los distintos órganos de *T. minuta* a lo largo del tiempo de experimento para las diferentes concentraciones de Pb en suelo. En todos los órganos estudiados se encontró interacción entre los factores analizados (concentración de Pb en suelo y tiempo de cultivo), es por ello que el análisis de los mismos no puede realizarse por separado. Se observó que el aumento de la concentración de Pb en suelo produce un incremento en el contenido de este metal en todos los órganos vegetales, demostrándose que existe un mecanismo de acumulación y translocación del contaminante en la planta.

La tendencia general muestra que en cualquiera de los órganos y de los tratamientos, *T. minuta* incrementa la acumulación de Pb entre la primera y segunda cosecha (35 y 65 días), pero no entre la segunda y la tercera (98 días). La raíz fue el órgano que presentó mayor acumulación de Pb, seguida por el tallo y finalmente las hojas. Las hojas senescentes presentaron concentraciones mayores de Pb que las hojas verdes en los tratamientos con 300 y 600 mg kg⁻¹ PS de Pb en suelo.

Figura 3.4. Concentraciones de Pb en raíz, tallo, hojas verdes y hojas senescentes de *Tagetes minuta* en distintos tiempos de desarrollo cuando crece expuesta a concentraciones crecientes de Pb en suelo. Resultados de los ANOVA comparando los resultados encontrados para un mismo órgano en los distintos tratamientos.



En todos los casos se encontró interacción estadística. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***)

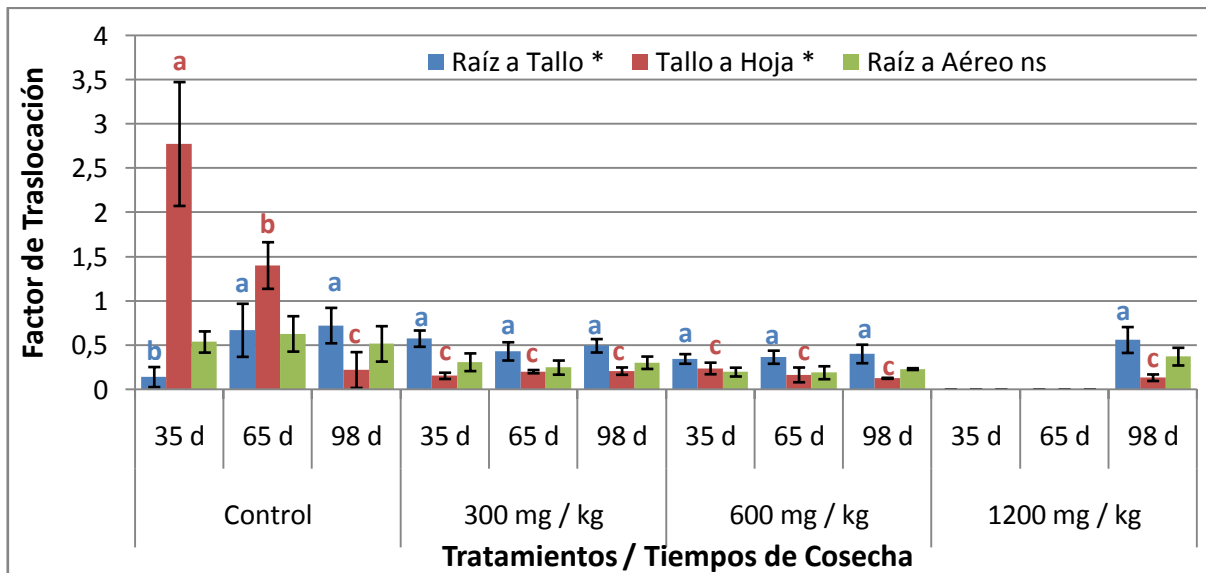
3.3.1.5. Factores de Translocación

Los resultados para los factores de translocación raíz-tallo, tallo-hoja y raíz-parte aérea en *T. minuta* durante los distintos períodos de desarrollo y los distintos tratamientos se muestran en la Figura 3.5.

Los FT no fueron afectados, en términos generales, por el tiempo de exposición al metal (tiempo de cultivo a cada concentración de Pb en suelo). Sin embargo, a todas las concentraciones de plomo en suelo, se observaron valores inferiores de FT R-T y T-H en comparación con el control, aunque a medida que las concentraciones de Pb en suelo eran mayores los FT se mantuvieron constantes. Factores de translocación inferiores a la unidad indican que la especie no es hiperacumuladora, si bien existe translocación ya que de lo contrario no se encontraría el metal en los órganos aéreos. Los elevados factores de translocación en plantas que crecían en el suelo control pueden indicar un proceso natural presente en esta especie, el que le permitiría movilizar este metal no esencial. Este proceso

podría inhibirse o indicar que se alcanzaron las concentraciones de saturación/toxicidad para este metal en las plantas, cuando las concentraciones de Pb en suelo son elevadas. No obstante, cabe destacar que incluso en suelos muy contaminados el 50% del Pb que ingresó a la raíz alcanzó el tallo y el 25% de este valor se acumuló en hojas.

Figura 3.5. Factores de translocación de Pb desde la raíz al tallo (FT R-T) y desde el tallo a las hojas en *Tagetes minuta* en los distintos estadios de desarrollo para concentraciones crecientes de Pb en el suelo.



Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (*), ns: no significativo. Tanto para FT R-T como para FT T-H se encontró interferencia estadística entre concentración de Pb en suelo y tiempo de cultivo, por lo que se comparan todas las barras de un mismo color entre sí.

En el tratamiento control, el Pb que ingresó a la raíz de la planta llegó rápidamente a hoja por lo cual pareciera que el FT R-T fue bajo, ya que el metal no se detuvo en el tallo. En los tratamientos con Pb, la planta no translocó tan rápidamente el Pb a hoja por lo que el FT R-T fue mayor que el FT T-H. Para apreciar más claramente el efecto de la concentración del metal en suelo sobre el factor de translocación de la *T. minuta* se calculó el FT R-A, el cual no presentó diferencias significativas entre los tratamientos a lo largo del tiempo.

3.3.1.6. Capacidad fitoextractora de plomo

Los resultados obtenidos en el análisis de la capacidad fitoextractora de plomo de *T. minuta* se muestran en la Figura 3.6. y en la Tabla 3.1. se exponen los resultados del ANOVA y la comparación de medias. En la primera se grafica la masa de plomo extraída

por órgano y por planta en los distintos tratamientos. Los resultados muestran una fuerte contribución por parte del tallo de la planta, ya que si bien este no fue el órgano que presentó mayores concentraciones de Pb ni FT, en términos absolutos el tallo mostró ser el principal destino de la acumulación de plomo por la planta. Los ANOVA (Tabla 3.1.) mostraron interacción entre la concentración de Pb en suelo y el tiempo de cultivo para todos los órganos en la extracción total por planta, no se pudo analizar estadísticamente el tratamiento de 1200 mg kg⁻¹ PS puesto a que no tuvo cosecha en todas las fechas estipuladas. Los resultados indican una tendencia general de aumento en la extracción de Pb a medida que aumentaban las concentraciones de plomo en el suelo (hasta los 600 mg kg⁻¹ PS, ya que se observó un fuerte decaimiento para el nivel más elevado). En cuanto al tiempo de cultivo, la acumulación de Pb en hojas se detuvo a partir de la segunda cosecha (65 días), no obstante la acumulación por tallos continuó incrementando hasta la tercera cosecha (98 días). La misma tendencia observada para tallos se encontró en los resultados de la extracción total de Pb por planta (barra apilada).

Figura 3.6. Extracción de Pb por órgano y por planta en *Tagetes minuta* en distintos tiempos de desarrollo cuando crece expuesta a concentraciones crecientes de Pb en suelo.

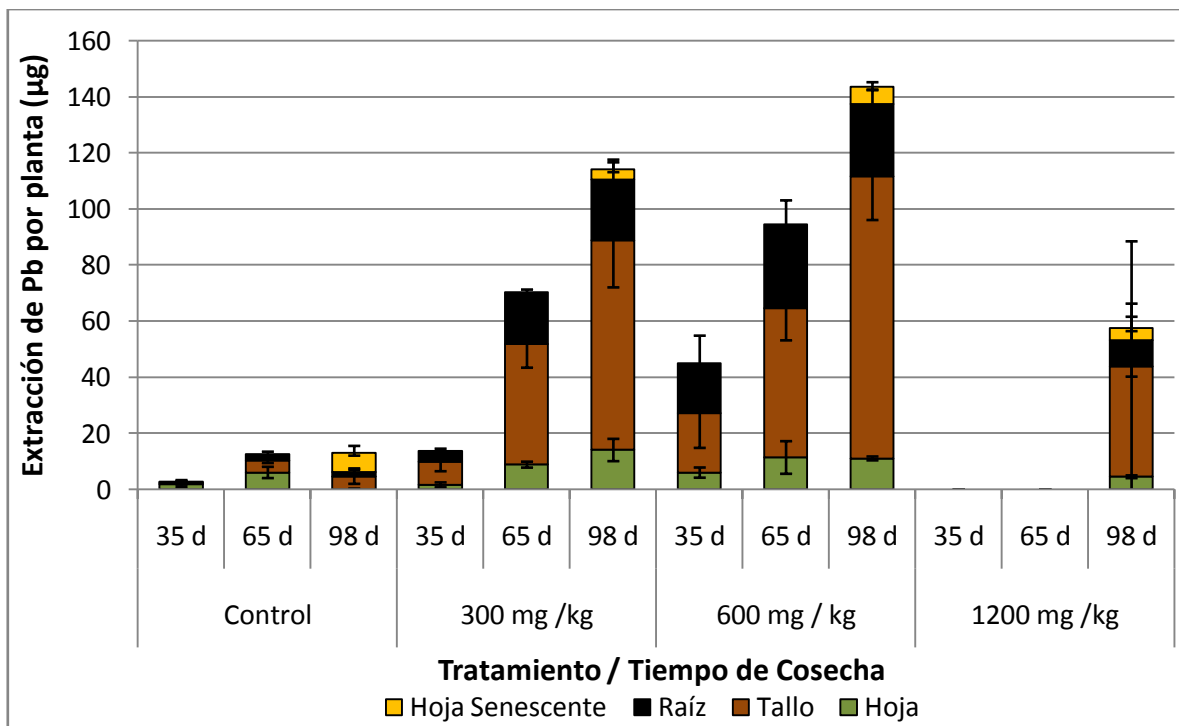


Tabla 3.1. Resultados de los ANOVA para la extracción neta promedio de plomo y su desviación estándar (μg) por órgano y por planta.

Hojas		Interacción $p < 0,01$	
	Control	300 mg kg^{-1} PS	600 mg kg^{-1} PS
35 días	2,0 \pm 0,8 c	1,7 \pm 0,9 c	6 \pm 2 b
65 días	6 \pm 2 b	9 \pm 1 a	11 \pm 5 a
98 días	0,12 \pm 0,03 c	14 \pm 4 a	11,1 \pm 0,7 a
Tallos		Interacción $p < 0,001$	
	Control	300 mg kg^{-1} PS	600 mg kg^{-1} PS
35 días	1,2 \pm 0,5 d	8 \pm 3 d	21 \pm 12 d
65 días	4,2 \pm 0,9 d	43 \pm 8 c	53 \pm 12 c
98 días	5 \pm 2 d	75 \pm 17 b	101 \pm 16 a
Raíces		Interacción $p < 0,05$	
	Control	300 mg kg^{-1} PS	600 mg kg^{-1} PS
35 días	0,5 \pm 0,1 c	4 \pm 2 c	18 \pm 8 b
65 días	2,3 \pm 0,8 c	18 \pm 1 b	30 \pm 8 a
98 días	1,7 \pm 0,7 c	21 \pm 6 b	26 \pm 5 a
Hoja Senescentes		ns	
	Control	300 mg kg^{-1} PS	600 mg kg^{-1} PS
98 días	7 \pm 3	4 \pm 1	6 \pm 2
Total		Interacción $p < 0,001$	
	Control	300 mg kg^{-1} PS	600 mg kg^{-1} PS
35 días	4 \pm 1d	14 \pm 10 d	45 \pm 22 c
65 días	13 \pm 4 d	70 \pm 19 c	94 \pm 25 b
98 días	14 \pm 6 d	114 \pm 28 b	144 \pm 24 a

Letras diferentes indican diferencias significativas con p indicado en tabla; ns: no significativo.

3.3.2. *Bidens pilosa*

3.3.2.1. Crecimiento

En la Figura 3.7. se exponen las curvas de crecimiento de *B. pilosa* tanto para altura (A) como para número de nudos (B) en cada tratamiento. Puede observarse que esta especie mostró un mayor crecimiento en altura que el tratamiento control en los tratamientos con 300 y 600 g kg^{-1} PS de Pb en suelo. No obstante cuando las concentraciones de plomo en suelo fueron de 1200 g kg^{-1} PS el desarrollo de la especie se vio comprometido. Cabe destacar que las plantas detuvieron su crecimiento alrededor de los 60 días de cultivo, al igual que lo observado en *T. minuta* para todos los tratamientos. Con respecto al número de

nudos, su incremento fue constante hasta la finalización del experimento, por lo que a pesar de no haber un crecimiento en altura a partir de los 60 días continuó el desarrollo de la biomasa, del mismo modo que se observó para *T. minuta*.

3.3.2.2. Supervivencia

En la Figura 3.8. se presentan los resultados de supervivencia para *B. pilosa* cultivada con concentraciones crecientes de plomo en suelo y control. El tratamiento control y el de 300 mg kg⁻¹ PS de Pb en suelo presentaron elevadas tasas de supervivencia, las que fueron constantes a lo largo de todo el experimento y similares entre sí. Los porcentajes de supervivencia para los tratamientos con elevadas concentraciones de plomo en suelo presentaron una supervivencia reducida de *B. pilosa* en los tiempos más prolongados de cultivo. No obstante cabe destacar que durante los primeros 60 días la supervivencia de la especie permitiría su empleo en suelos de hasta 1200 mg kg⁻¹ PS de Pb, ya que se observó sobrevivida en más del 80% de los individuos.

Figura 3.7. Crecimiento en A) altura y B) número de nudos de *Bidens pilosa* en presencia de concentraciones crecientes de Pb en suelo.

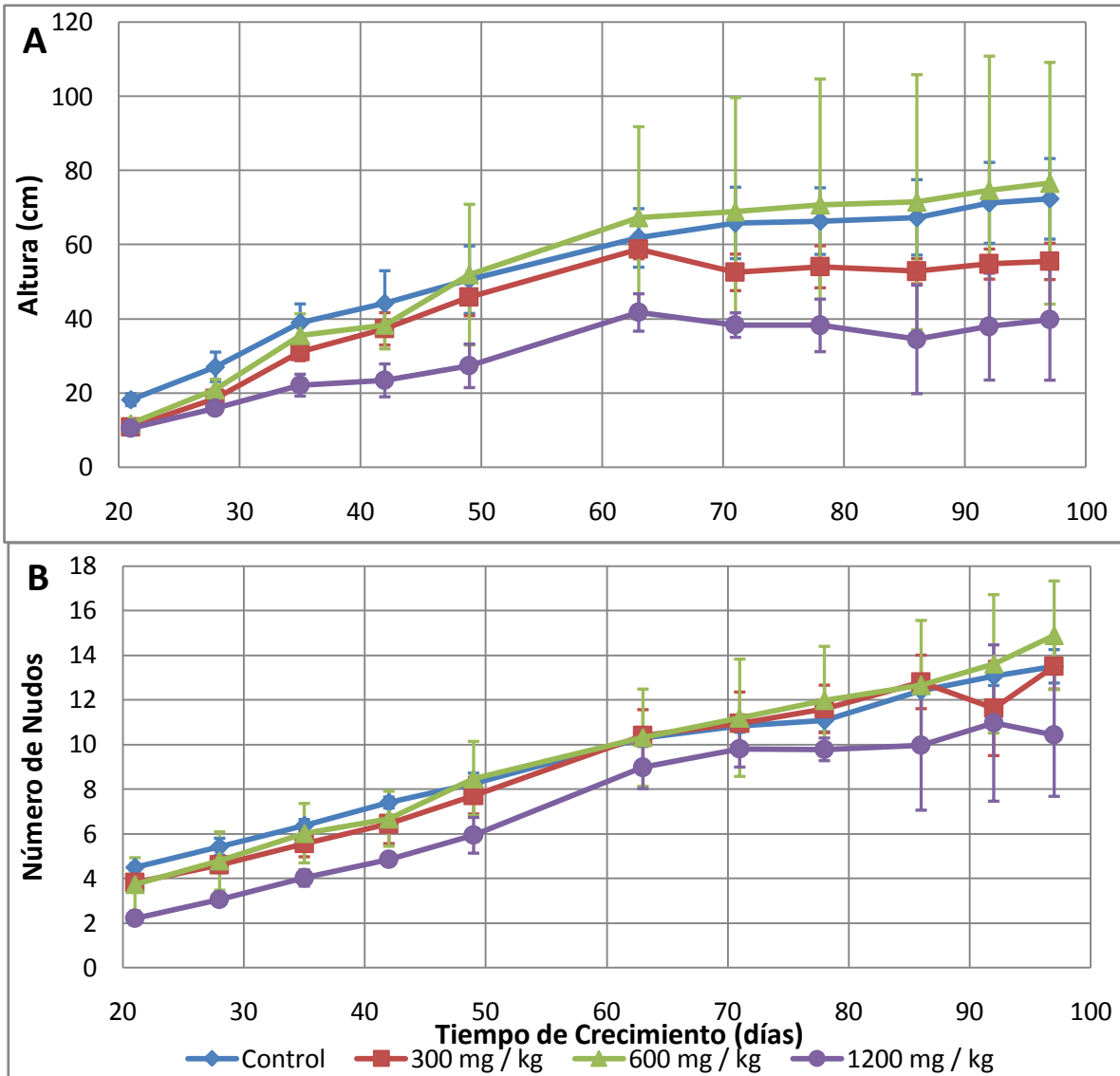
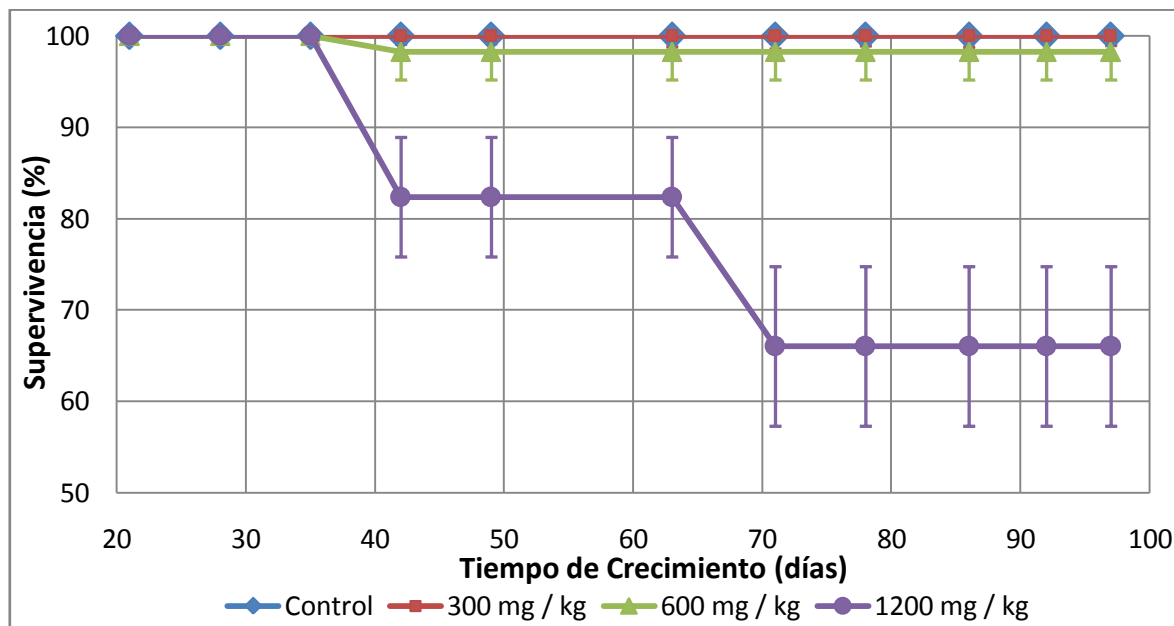


Figura 3.8. Supervivencias de *Bidens pilosa* a concentraciones crecientes de Pb en suelo.



3.3.2.3. Producción de biomasa

Los resultados de biomasa seca producida por planta y por órgano para *B. pilosa* se exponen en la Figura 3.9 y los del ANOVA, en la Tabla 3.2. A diferencia de *T. minuta*, esta especie presentó en el tratamiento de 1200 mg kg⁻¹ PS de Pb en suelo una supervivencia más alta aun a tiempos largos (Figura 3.8), lo que permitió realizar todas las cosechas propuestas. Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) para la biomasa foliar y de tallos, no presentaron interacción entre los dos factores estudiados. El aumento de concentración de Pb en suelos produjo un incremento en la masa de peso seco en hojas y tallos, si bien a partir de la concentración de 600 mg kg⁻¹ PS se produjo un decaimiento abrupto en la producción de biomasa. En cuanto al tiempo de exposición, ambos órganos aéreos mostraron un incremento significativo de la biomasa entre la primera y la segunda cosecha (35 y 65 días), manteniéndose constante entre la segunda y la tercera (98 días). Para el caso de las raíces, se encontró interacción estadística entre los factores estudiados por lo que el análisis no puede realizarse por separado (Tabla 3.2). Los resultados del ANOVA para la biomasa seca total por planta no mostraron interacción entre los factores, la concentración de Pb en suelo no tuvo efecto sobre la biomasa hasta alcanzar los 1200 mg

kg⁻¹ PS, mientras que la biomasa total por planta fue incrementando significativamente a lo largo de todo el experimento.

Figura 3.9. Producción de biomasa seca por planta y por órgano en la especie *Bidens pilosa* en distintos momentos de su desarrollo frente a concentraciones crecientes de Pb.

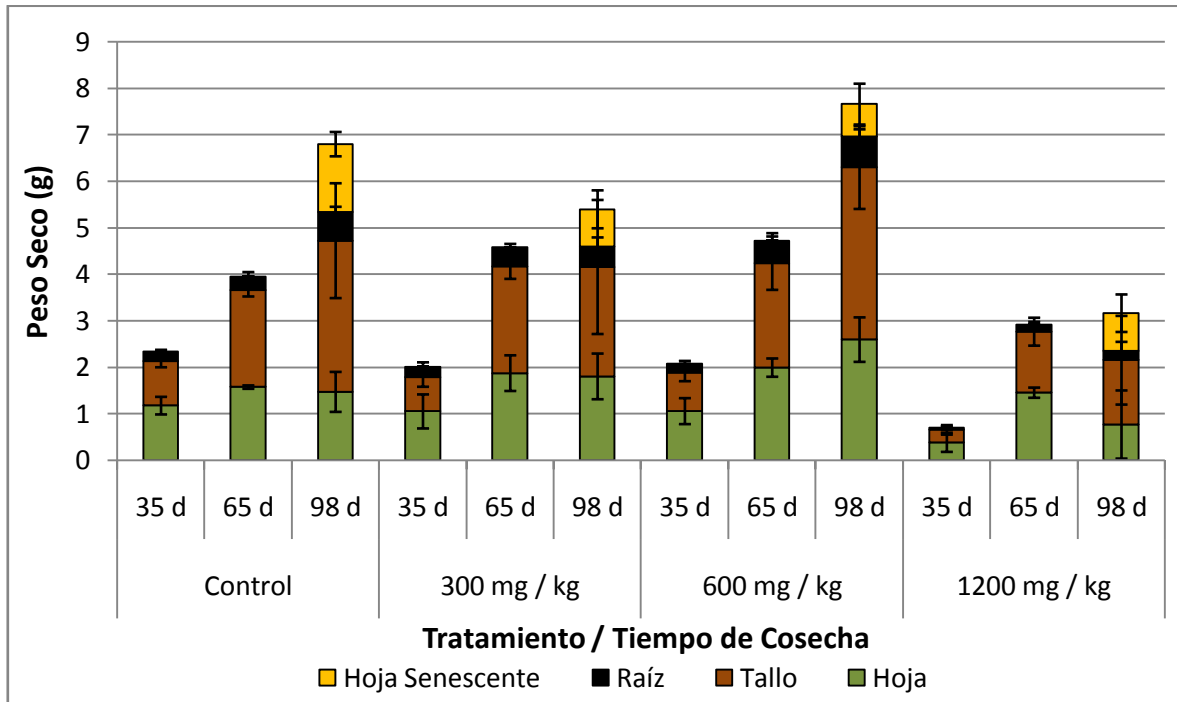


Tabla 3.2. Resultados de ANOVA para la comparación de la biomasa producida en distintos órganos por *Bidens pilosa* cuando crece en suelos con concentraciones crecientes de Pb.

Hojas				
Concentración de Pb en Suelo ***				
Control	300 mg kg ⁻¹ PS	600 mg kg ⁻¹ PS	1200 mg kg ⁻¹ PS	
b	b	a	c	
Tiempo de Cultivo ***				
35 días	65 días		98 días	
b	a		a	
Tallos				
Concentración de Pb en suelo ***				
Control	300 mg kg ⁻¹ PS	600 mg kg ⁻¹ PS	1200 mg kg ⁻¹ PS	
b	a	a	b	
Tiempo de Cultivo ***				
35 días	65 días		98 días	
b	a		a	
Raíces				
Interacción Tiempo de cultivo x Concentración de Pb en Suelo **				
	Control	300 mg kg ⁻¹ PS	600 mg kg ⁻¹ PS	1200 mg kg ⁻¹ PS
35 días	c	c	c	d
65 días	c	b	b	c
98 días	a	b	a	c
Hojas Senescentes **				
98 días	Control	300 mg kg ⁻¹ PS	600 mg kg ⁻¹ PS	1200 mg kg ⁻¹ PS
	a	b	b	b
Biomasa total por planta				
Concentración de Pb en Suelo ***				
Control	300 mg kg ⁻¹ PS	600 mg kg ⁻¹ PS	1200 mg kg ⁻¹ PS	
a	a	a	b	
Tiempo de cultivo ***				
35 días	65 días		98 días	
c	b		a	

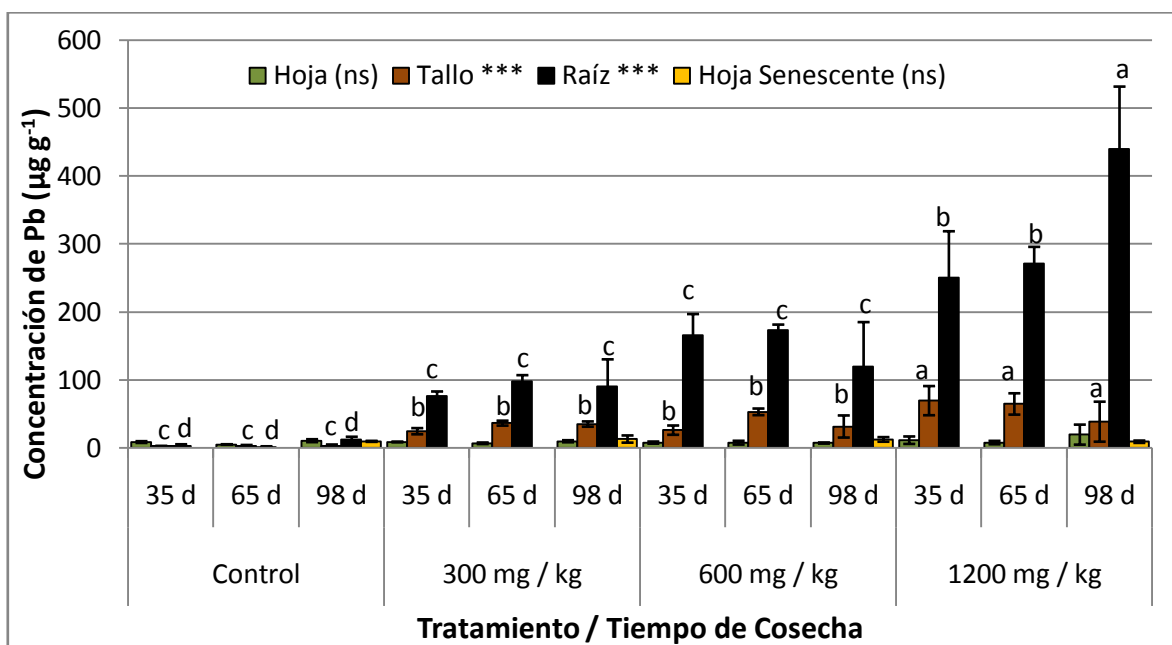
Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), o $p < 0,001$ (***)

3.3.2.4. Acumulación de Pb en raíz, tallo y hojas

En la Figura 3.10. se muestran las concentraciones de Pb halladas en los distintos órganos de *B. pilosa* a lo largo del experimento y en los diferentes tratamientos. En esta especie se observó que la concentración de Pb en hojas, tanto funcionales como senescentes, no se modificó en función de la concentración de Pb en suelo ni con el tiempo de exposición. La acumulación de Pb en tallos solo respondió a la concentración del metal

en suelo, encontrándose una asociación positiva entre ambos fenómenos. En raíz se encontró la misma tendencia, aunque solo en las concentraciones más elevadas del metal en suelo (1200 mg kg^{-1} PS) se observó una acumulación superior cuando el tiempo de cultivo fue el más prolongado (98 días). La raíz fue el órgano que presentó mayor concentración de Pb a lo largo del experimento, seguida por el tallo y finalmente las hojas.

Figura 3.10. Concentraciones de Pb en raíz, tallo, hojas verdes y hojas senescentes de *Bidens pilosa* en distintas etapas del desarrollo de las plantas cuando crecen expuestas a concentraciones crecientes de Pb en suelos.

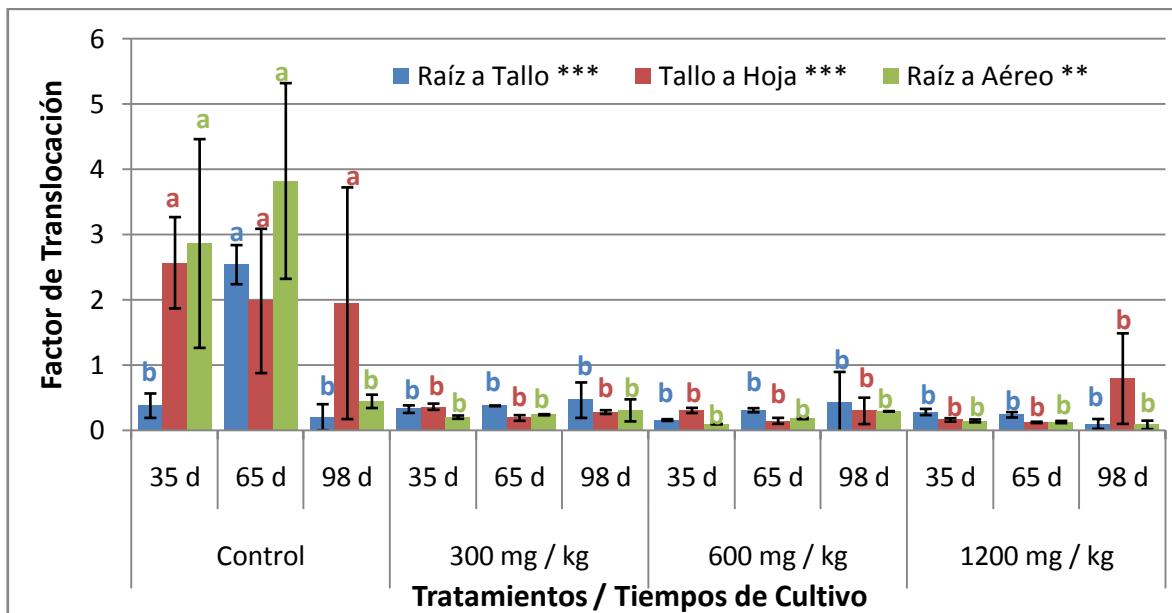


Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para el mismo órgano con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) o $p < 0,001$ (***). La ausencia de letras indica diferencias no significativas (ns). Las hojas (verdes y senescentes) no mostraron diferencias significativas en la acumulación de Pb entre los tratamientos. La concentración de Pb en tallos mostró diferencias sólo al comparar los tratamientos de suelo. La concentración de Pb en raíces mostró interacción estadística entre la concentración del metal en suelo y el tiempo de cultivo.

3.3.2.5. Factores de Translocación

Los factores de translocación raíz-tallo, tallo-hoja y raíz-parte aérea de *B. pilosa* durante los distintos períodos de desarrollo y en los distintos tratamientos, se presentan en la Figura 3.11. Los valores de los tres FT no fueron afectados en términos generales por el tiempo de exposición al plomo, sin embargo, sí se modificaron por diferentes concentraciones del metal en suelo, a medida que aumentó el contenido de Pb en suelo ambos FT disminuyeron.

Figura 3.11. Factores de translocación de Pb desde la raíz al tallo, desde el tallo a la hoja y desde la raíz a la parte aérea en *Bidens pilosa* en las distintas etapas del desarrollo de las plantas cuando crecen expuestas a concentraciones crecientes de Pb en suelo.



Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos con $p < 0,01$ (**) y con $p < 0,001$ (***). Para todos los FT se encontró interacción estadística entre concentración de Pb en suelo y tiempo de cultivo, por lo que se comparan todas las barras de un mismo color entre sí.

3.3.2.6. Capacidad fitoextractora de plomo

En la Figura 3.12. se exponen los resultados encontrados para la extracción de Pb por órgano y por planta en *B. pilosa*. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA (Tabla 3.3.) a dos factores, no habiéndose detectado interacción tiempo-tratamiento para ningún órgano ni para el total de la planta entre el contenido de Pb en suelo y el tiempo de cultivo. Por este motivo estos factores se estudiaron por separado. Las tendencias evidenciadas por el análisis estadístico fueron las mismas en los órganos por separado que en la planta completa: la acumulación se incrementó significativamente entre la primera y la segunda cosecha (35 y 65 días) sin presentar cambios a partir de ese momento. En cuanto al contenido de Pb en suelo, su aumento produjo un incremento significativo sobre la extracción total del metal. Este incremento fue perceptible solo a partir de la segunda cosecha a los 65 días en los tallos la raíces y la planta completa. Cabe destacar que al llegar al tratamiento con la máxima concentración en suelo la extracción se vio limitada.

La capacidad fitoextractora de plomo en *B. pilosa* muestra una fuerte contribución del tallo de la planta. Si bien éste no es el órgano que presentó las mayores concentraciones de Pb, pareciera ser el principal destino del mismo cuando se analiza la extracción del metal en términos absolutos.

Figura 3.12. Fitoextracción de Pb de suelos por órgano y por planta de *Bidens pilosa* en los distintos estadios de desarrollo de las plantas cuando crecen expuestas a concentraciones crecientes de Pb en suelo.

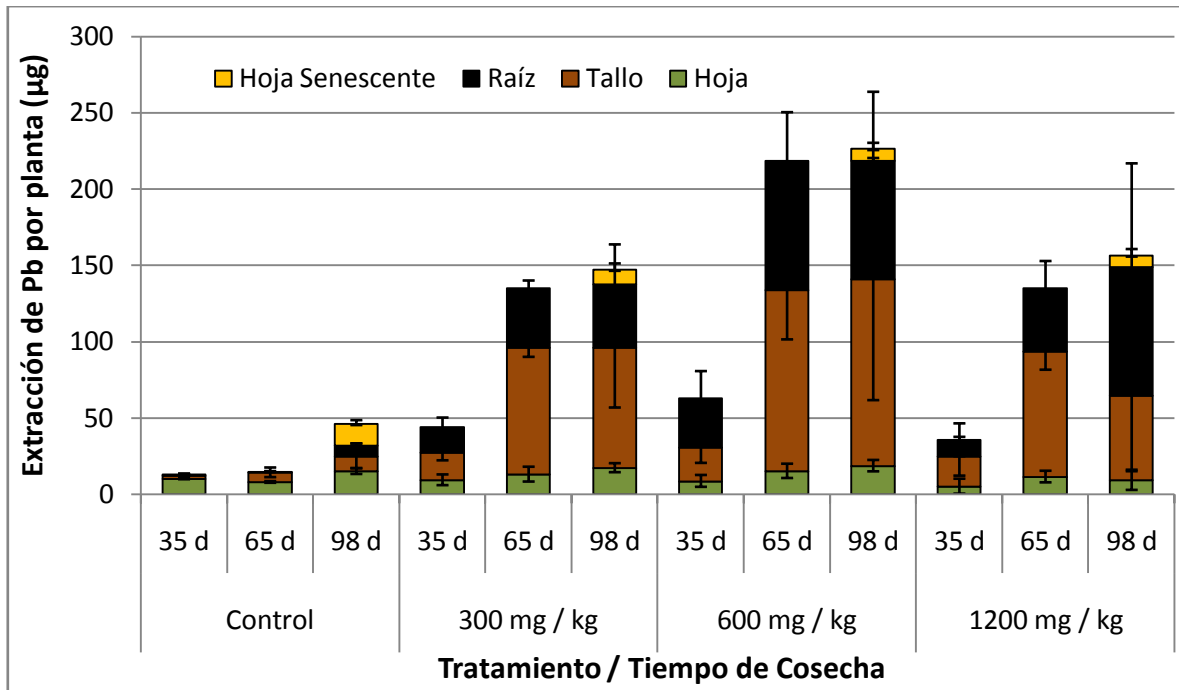


Tabla 3.3. Resultados de los ANOVA para la extracción neta promedio de plomo y su desviación estándar (μg) por órgano y por planta para *Bidens pilosa*.

Hojas				
	Control ***	300 mg kg ⁻¹ PS ^{ns}	600 mg kg ⁻¹ PS ^{ns}	1200 mg kg ⁻¹ PS ^{ns}
35 días ^{ns}	10 ± 2 B	9 ± 1 A	9 ± 1 A	5 ± 2 A
65 días ^{ns}	8 ± 2 B	13 ± 2 A	15 ± 3 A	11 ± 2 A
98 días ^{ns}	15 ± 2 A	17 ± 3 A	18 ± 3 A	9 ± 2 A
Tallos				
	Control ^{ns}	300 mg kg ⁻¹ PS [*]	600 mg kg ⁻¹ PS ^{ns}	1200 mg kg ⁻¹ PS ^{ns}
35 días ^{ns}	3 ± 1 A	18 ± 4 B	22 ± 5 A	20 ± 4 A
65 días ^{***}	6 ± 1 bA	83 ± 10 aA	119 ± 17 aA	82 ± 9 aA
98 días ^{ns}	10 ± 9 A	79 ± 20 A	122 ± 29 A	55 ± 30 A
Raíces				
	Control ***	300 mg kg ⁻¹ PS ^{ns}	600 mg kg ⁻¹ PS ^{ns}	1200 mg kg ⁻¹ PS ^{ns}
35 días [*]	0,7 ± 0,1 bB	17 ± 4 bA	32 ± 6 aA	11 ± 5 bA
65 días ^{**}	0,5 ± 0,1 cB	39 ± 10 bA	85 ± 14 aA	41 ± 10 bA
98 días ^{ns}	7 ± 5 A	42 ± 24 A	78 ± 35 A	85 ± 25 A
Hojas Senescentes				
	Control	300 mg kg ⁻¹ PS	600 mg kg ⁻¹ PS	1200 mg kg ⁻¹ PS
98 ^{ns}	14 ± 2	10 ± 3	8 ± 2	8 ± 2
Total				
	Control ^{**}	300 mg kg ⁻¹ PS [*]	600 mg kg ⁻¹ PS ^{**}	1200 mg kg ⁻¹ PS ^{ns}
35 días ^{ns}	13 ± 3 B	44 ± 9 B	63 ± 12 B	35 ± 10 A
65 días ^{***}	15 ± 3 cA	135 ± 20 bA	219 ± 24 aA	135 ± 20 bA
98 días ^{ns}	46 ± 30 A	147 ± 38 A	226 ± 43 A	157 ± 39 A

No hubo interacción estadística entre los factores estudiados, por lo que los ANOVA se realizan para cada uno por separado. Se comparan los valores de extracción entre los tratamientos de suelo para cada tiempo de cultivo (letras minúsculas) y entre los tiempos de cultivo para cada tratamiento de Pb en suelo (letras mayúsculas). Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), o $p < 0,001$ (***) ; ns: no significativo.

3.4. Discusión

T. minuta y *B. pilosa* mostraron una elevada tolerancia a elevadas concentraciones de Pb en suelos, tanto en términos de crecimiento y producción de biomasa como en supervivencia. Si se considera que la forma de Pb utilizada para enriquecer el suelo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) es una sal con alta solubilidad, y que por ende la casi totalidad del metal se encuentra en una forma biodisponible, puede decirse que estas especies cumplen ampliamente con el requisito de tolerancia para su empleo en fitorremediación (Tangahu et al., 2011).

En cuanto a la eficiencia en la extracción de Pb, ambas especies mostraron concentraciones del metal relativamente elevadas en raíz y tallos aunque no en hojas. Los análisis de variación temporal revelaron que la acumulación no se incrementa en las plantas después de los 65 días de cultivo, al igual que la producción de biomasa. La capacidad fitoextractora de plomo por planta mostró esta tendencia para la especie *B. pilosa* pero no para *T. minuta*. Si se considera la posibilidad de implementar un programa de fitorremediación de suelos contaminados con plomo mediante el empleo de estas especies, deberá tenerse en cuenta que para ciclos de un año podrían repetirse los cultivos entre 2 y 3 veces abarcando 2 meses cada periodo, mientras que si se realizaran cultivos de 98 días de duración esto permitiría un solo ciclo anual.

Los factores de translocación para estas especies no fueron muy elevados, pero cabe destacar que se mantuvieron relativamente constantes a lo largo del tiempo y en los diferentes niveles de exposición a Pb. De todas maneras la translocación, cumple con el requisito para su uso en fitoextracción ya que el contaminante ingresa a la parte aérea de la planta la que puede ser cosechada con facilidad (Ghosh y Singh, 2005). De igual modo, en términos absolutos la mayor cantidad de Pb extraído por ambas especies se encontró en la parte aérea.

Tagetes minuta mostró una concentración de Pb mayor en hojas senescentes que en hojas verdes. Este incremento en la acumulación del contaminante en las hojas cuando las mismas envejecen, puede estar relacionado con los mecanismos de redistribución de nutrientes propios del proceso de senescencia (Himmelblau y Amasino, 2001). No obstante la presencia de hojas senescentes durante la última cosecha no produjo un aumento significativo en la extracción total por planta, por lo que este fenómeno no justifica prolongar el tiempo óptimo de cultivo para las especies fitoextractoras.

El comportamiento relacionado con la tolerancia al Pb fue similar en las dos especies estudiadas. Una diferencia que cabe destacar fue la mayor supervivencia de *B. pilosa* principalmente en la exposición a concentraciones más altas de Pb en suelo. No obstante, esta especie consiguió esta supervivencia a costa de una disminución abrupta de la biomasa disminuyendo así la tasa de extracción absoluta por planta. Para *T. minuta* los individuos que sobrevivieron a elevadas concentraciones de plomo lograron un desarrollo normal. En

lo que respecta a la eficiencia fitoextractora, los resultados de extracción total de Pb por planta de *B. pilosa* fueron muy superiores a los de *T. minuta*. Esta diferencia se debe principalmente a la mayor biomasa producida por la primera especie.

Los resultados de acumulación de plomo y capacidad fitoextractora encontrados en esta etapa experimental fueron inferiores a los hallados en estudios de campo mediante el diseño expuesto en el Capítulo II. Esto puede explicarse por el uso de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en el enriquecimiento experimental de los suelos para exposiciones en invernadero, una forma química que no es la mayoritaria en suelos naturales. Si bien en muchos estudios reportados en bibliografía se han logrado elevar las tasas de extracción de Pb en distintas especies mediante el incremento de la biodisponibilidad del metal, esto se realiza mediante el uso de agentes quelantes que son moléculas orgánicas (naturales o sintéticas) que capturan el Pb del suelo y al incorporarlo en su estructura lo hacen menos tóxico (Freitas et al., 2013; Pourrut et al., 2011). Mediante el uso de nitrato de plomo (II), el Pb soluble pasa a estar disponible en forma de ion, siendo muy tóxico para plantas y desencadenando respuestas tanto en ellas como en los microorganismos del suelo asociados al crecimiento vegetal (McGrath et al., 2001; Pourrut et al., 2008).

3.5. Conclusiones

La especies nativas *Bidens pilosa* y *Tagetes minuta* mostraron una elevada tolerancia a elevados niveles de Pb en suelos cumpliendo ampliamente el requisito de tolerancia al tóxico para su empleo en fitorremediación de suelos contaminados con este metal. Para estas especies se determinó un tiempo óptimo de cultivo de aproximadamente 2 meses. Los factores de translocación del metal en plantas para estas especies no fueron muy elevados, pero como un comportamiento positivo para su aplicación, éstos no se vieron afectados a lo largo del tiempo ni por los diferentes niveles de concentración de plomo en suelos. Por otro lado, la mayor acumulación de Pb en la fitoextracción tuvo lugar en órganos aéreos. *B. pilosa* mostró mayor eficiencia fitoextractora de Pb que *T. minuta*, principalmente en suelos con 600 mg kg^{-1} PS de Pb donde la extracción por planta tuvo valores de $226 \text{ }\mu\text{g/planta}$ frente a $140 \text{ }\mu\text{g/planta}$ en *T. minuta*.

4. Capítulo IV.

Comportamiento del sistema radical en relación a la extracción de Pb por *Bidens pilosa*, *Tagetes minuta* y *Brassica juncea* cuando crecen en suelos con elevadas concentraciones del metal en presencia de biofertilizantes.

Resumen

En un primer estudio observacional a campo se encontraron elevadas concentraciones de Pb en tejidos aéreos de *T. minuta* y *B. pilosa* que sugirieron su empleo en fitorremediación de suelos contaminados con este metal. En el capítulo anterior se reportaron los resultados de ensayos realizados para conocer el comportamiento de estas especies cuando crecen en suelos enriquecidos con Pb y los resultados obtenidos en la acumulación en condiciones de invernadero no fueron comparables con los encontrados previamente a campo, donde las especies presentaron una mayor eficiencia de extracción de plomo. Es por ello que en este capítulo se incluyó en el diseño experimental una especie ampliamente reportada como acumuladora de Pb, *Brassica juncea*. La decisión de incluirla se fundamentó en que su estudio simultáneo con las nativas permite realizar un análisis relativamente independiente de los valores de acumulación de Pb encontrados en las especies estudiadas y poder analizar el éxito de estas en comparación con una ya estandarizada como muy eficiente fitoextractora de plomo. Los experimentos realizados en este capítulo siguieron un diseño bifactorial estudiándose en ellos el efecto de microorganismos promotores de crecimiento vegetal sobre el crecimiento longitudinal del sistema radical, la producción de biomasa subterránea y aérea y las tasas de extracción del metal cuando las plantas crecen en suelos enriquecidos con distintos niveles de Pb. También se evaluó la posible preferencia del sistema radical por sectores más limpios o más contaminados del suelo durante su crecimiento. Para cumplir estos objetivos se emplearon rizocajas transparentes de acrílico en las que se cultivó un individuo por caja, en condiciones de suelo homogéneas y heterogéneas.

La acumulación de plomo expresada como extracción por planta lograda por *B. pilosa* fue muy superior a la de las otras dos especies, más del doble que *B. juncea* (especie de referencia) y el doble que *T. minuta*.

Los resultados muestran que ninguna de las tres especies tuvo preferencia por suelos con altos o bajos niveles de Pb, ya que sus raíces crecieron de manera similar en todas las direcciones. No obstante existe la posibilidad de que en determinadas condiciones algunos microorganismos, como por ejemplo *Azospirillum brasilense*, induzcan al desarrollo de la raíz con tropismo positivo hacia el Pb, al menos para las especies *B. juncea* y *B. pilosa*.

Cabe destacar que se demostró que el efecto de los organismos promotores del crecimiento vegetal sobre la acumulación de Pb en plantas es un fenómeno complejo, altamente específico, ya que las combinaciones de especies de microorganismos funcionaron de modo muy disímil sobre las tres especies vegetales. Este fenómeno se asoció fuertemente con las condiciones del suelo. Aun así, pudo establecerse que el empleo de biofertilizantes durante el proceso de fitoextracción de Pb de suelos enriquecidos con ese metal por *Tagetes minuta*, *Bidens pilosa* o *Brassica juncea* puede potenciar la tasa de extracción total si se utilizan *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens* para la primera, y una combinación de *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens* para las otras dos especies.

4.1. Introducción

La principal barrera para el ingreso de Pb a la planta reside en la raíz, más específicamente en la banda de Caspary (Pourrut y col, 2011). Esto presupone que el metal ingresa al cortex radical pero no al cilindro central donde está el xilema, evitándose así la translocación a la parte aérea. Las partes más jóvenes de la raíz, cercanas al meristema, no presentan un completo desarrollo de la banda de Caspary y por estar en proceso de elongación sus paredes celulares son más delgadas que en el resto de la raíz. De este modo el ingreso de Pb por estos sectores se encuentra facilitado (Seregin y Ivanov, 1997). No obstante, uno de los principales efectos fitotóxicos del Pb es la reducción en el crecimiento de la raíz como así también la inducción del proceso de suberificación de la misma. Estos dos efectos tienden a evitar el ingreso de Pb en la planta (Gleeson, 2007).

Los microorganismos del suelo presentes en la rizosfera de las plantas interactúan con estas de diversa manera, pudiendo influenciar las tasas de acumulación y translocación de metales pesados, ya sea aumentándolas como reduciéndolas (Ahmed et al., 2012; Gao et al., 2011; Gao et al., 2010; McGrath et al., 2001; White et al., 1995). Las especies pertenecientes al grupo de las brassicáceas han sido muy estudiadas para su uso en fitorremediación de suelos contaminados con diversos metales, incluso se ha observado en estas que los microorganismos asociados a la rizosfera influyen positivamente en su crecimiento, aumentando su potencial extractor. Algunos de estos microorganismos

naturales son: *Phyllobacterium brassicacearum*, *Serratia plymuthica*, *Comamonas terrigena*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Agromyces cerinus*, *Acinetobacter rhizosphaerae*, *Microbacterium oxydans*, *Paenibacillus lautus*, *Arthrobacter globiformis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Variovorax paradoxus* y *Trichoderma* spp., entre otros (Larcher et al., 2008). El incremento en el éxito de la fitoextracción de metales tóxicos del suelo cuando una especie presenta algunos de estos microorganismos asociados a su rizosfera podría estar relacionado con una mayor superficie de contacto raíz-suelo y una mayor capacidad para intercambiar iones a través de la pared celular (Salt et al., 1998). Tradicionalmente, el aumento en el desarrollo del sistema radical y en la producción de biomasa se logra mediante el uso de fertilizantes inorgánicos. Sin embargo, estos no solo son costosos y presentan consecuencias ambientales, sino que también pueden alterar la disponibilidad del metal en el suelo, impidiendo la extracción de éste por plantas fitorremediadoras. Por este motivo el empleo de fertilizantes orgánicos, así como el de biofertilizantes, representan una mejor opción en términos de favorecer el crecimiento de las plantas y con ello mejorar su capacidad fitoextractora, ya que uno de los modos de acción de este tipo de fertilizantes es a través de la promoción del crecimiento tanto de la raíz como del resto de la planta.

El objetivo de este capítulo fue estudiar el efecto de biofertilizantes comerciales comúnmente usados en agricultura sobre el comportamiento radical de las especies nativas *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* y de la especie de referencia *Brassica juncea* ampliamente reportada como fitoextractora de Pb (Ahmed et al., 2012; Lim et al., 2004; Salido et al., 2003) cuando crecen en suelos contaminados con este metal. Dado que el modo de acción de los biofertilizantes es la promoción del crecimiento vegetal, se planteo como hipótesis que la aplicación de este producto se reflejara en una mayor producción de biomasa, y que esto aumentaría la extracción neta de Pb de dos posibles maneras: acumulando las mismas concentraciones del contaminante en los órganos pero produciendo más biomasa, con lo cual en total se extraería mayor masa de Pb; o aumentando tanto la biomasa como la concentración ya que para crecer más se establece un mayor flujo de nutrientes desde el suelo hacia la planta.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Preparación de los suelos

Los suelos utilizados en esta experiencia fueron obtenidos de un área rural cercana a Bouwer distante de fuentes industriales de contaminación. Este sitio fue denominado en el Capítulo I “Control interno” y sus propiedades pueden observarse en las Tablas 1.1. y 1.2. Para su recolección se removieron manualmente la cobertura vegetal y los objetos extraños de la superficie. Utilizando una pala de acero inoxidable se recolectó suelo superficial (hasta una profundidad de 15 cm), y se lo almacenó en bolsas plásticas. Una vez en el laboratorio se secó a temperatura ambiente, procediéndose luego al tamizado a 2 mm y a la homogeneización del mismo. Este suelo fue fraccionado en tres partes iguales. Una parte se conservó sin modificaciones para ser utilizada en el tratamiento control. Las otras dos partes fueron enriquecidas con Pb (NO₃)₂ hasta alcanzar concentraciones de 300 y 600 mg kg⁻¹ de Pb PS de suelo. Estas concentraciones fueron verificadas tomando muestras aleatorias y analizándolas del mismo modo que lo descrito para análisis de suelos en el Capítulo I para la fracción pseudototal encontrándose los siguientes valores de Pb: Tratamiento control: 11,4 ± 0,9 mg kg⁻¹ PS; Tratamiento 300 mg kg⁻¹ PS: 251 ± 13 mg kg⁻¹ PS; Tratamiento 600 mg kg⁻¹ PS: 576 ± 39 mg kg⁻¹ PS.

4.2.2. Características de los biofertilizantes empleados

Los biofertilizantes utilizados en este experimento fueron aportados por la empresa Greenquality, quien suministró 4 productos diferentes:

- *Bradyrhizobium japonicum* + *Azospirillum brasilense* + *Pseudomonas fluorescens* (Biofertilizante triple)
- *Azospirillum brasilense* + *Pseudomonas fluorescens* (Biofertilizante Ab+Pf)
- *Azospirillum brasilense* (Biofertilizante Ab)
- *Pseudomonas fluorescens* (Biofertilizante Pf)

La bacteria *Bradyrhizobium japonicum* favorece la formación de rizobios en el sistema radical de las especies vegetales, incluso en las no leguminosas y también puede liberar sideróforos solubilizando fósforo y otros nutrientes del suelo (Antoun et al., 1998; Bashan et al., 2014). La bacteria *Azospirillum brasilense* promueve el crecimiento y la elongación de la raíz al mismo tiempo que fija nitrógeno (Bashan, 1986), y finalmente, la bacteria *Pseudomonas fluorescens* no solo promueve el crecimiento de la raíz sino que también puede liberar sideróforos (Vessey, 2003).

4.2.3. Material vegetal

Semillas de *B. pilosa* y *T. minuta* fueron recolectadas en el predio de la localidad de Bouwer donde estuvo radicada una fundición de plomo. Las semillas de *B. juncea* fueron obtenidas de un banco de semillas comerciales (Rareplants, Alemania; BJ 3870). Todas fueron sometidas a un proceso de imbibición pasiva con agua corriente durante 24 horas, luego fueron esterilizadas con NaClO AL 1% V/V mediante agitación manual durante 10 min después de lo cual fueron lavadas con agua destilada y tratadas con cada uno de los biofertilizantes según las indicaciones del fabricante del producto. Posteriormente, las semillas se hicieron germinar sobre papel de filtro humedecido con agua destilada (4 d en oscuridad). Una vez que las plántulas tuvieron al menos un par de hojas verdaderas, se trasladaron a las rizocajas de 9 x 9 cm (Figura 4.1. C) las que contenían suelo correspondiente a cada uno de los tratamientos y se agregó 1 mL del biofertilizante.

4.2.4. Diseño experimental

El diseño experimental fue a dos factores (concentración de Pb en suelo y biofertilizante aplicado) y para los experimentos se emplearon rizocajas y la metodología descrita por Whiting et al. (2000). Para ello se utilizaron cajas de Petri cuadradas de plástico transparente, de 9 cm de lado y 1,5 cm de espesor. Se las perforó en un lateral para que por este orificio pudiera crecer la planta y se las completó con suelo correspondiente a los distintos tratamientos. Los tratamientos en relación al contenido de Pb en suelo fueron: suelo control (C), suelo enriquecido con 300 mg kg⁻¹ PS de Pb (300), y suelo enriquecido con 600 mg kg⁻¹ de Pb PS (600), conformando estos tratamientos homogéneos. También se

utilizaron rizocajas con tratamiento mixto, en las cuales la mitad de la caja fue rellena con un suelo con una concentración de Pb y la otra mitad con otra concentración del metal (C-300 y C-600) a fin de evaluar la preferencia de la raíz durante su crecimiento (quimiotropismo) (Figura 4.1. A y B). De este modo el factor “concentración de Pb en suelo” fue graduado en 5 niveles (C, 300, 600, C-300 y C-600). El segundo factor, “biofertilizante aplicado”, fue graduado en 5 niveles: sin inocular (Control); inoculado con el biofertilizante triple (Triple); inoculado con *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens* (Ab+Pf); inoculado con *Azospirillum brasilense* (Ab); inoculado con *Pseudomonas fluorescens* (Pf). De este modo, considerando los dos factores se obtuvo un total de 25 tratamientos, cada uno con 3 réplicas reales consistiendo cada una en un único individuo vegetal.

Las rizocajas fueron cubiertas con papel aluminio a fin de que la luz no afectara el desarrollo de las raíces, y se las colocó en un ángulo de 75 ° para que el sistema radical creciera sobre una de las paredes transparentes, facilitando así la observación (Figura 4.1. D y E). El tiempo de duración del experimento fue de 65 días desde el trasplante a las rizocajas. Cumplido este tiempo, las plantas fueron cortadas en la base del tallo a fin de separar la parte aérea de la raíz. La parte aérea, aún en la caja, fue fotografiada y escalada métricamente con una cámara de alta resolución (Figura 4.1. F). Luego la raíz fue retirada cuidadosamente para obtener la totalidad de su biomasa, lavada con agua milli-Q y sonicada a fin de eliminar el suelo adherido a ella. La parte aérea también fue lavada con agua milli-Q, y ambas partes fueron llevadas a estufa a 60 °C hasta obtener peso seco constante. Se determinó la biomasa total producida por planta en la parte radical y en la parte aérea. Luego, las muestras fueron trituradas con molinillo de acero inoxidable y conservadas en bolsas plásticas herméticas hasta su posterior análisis.

4.2.5. Determinación de la longitud de la raíz

A fin de evaluar el efecto de promoción del crecimiento vegetal y comparar los distintos tratamientos (concentración de Pb en suelo y biofertilizantes), se utilizaron las fotografías escaladas para determinar la longitud total de la raíz. Para los tratamientos homogéneos en cada rizocaja y para los tratamientos heterogéneos la longitud de raíz en

cada lado de la rizocaja (Figura 4.1. G y H). Para ello se utilizó el software Image J (Ferreira y Rasband, 2011) acoplado con un plugin denominado Smartroot (Lobet et al., 2011).

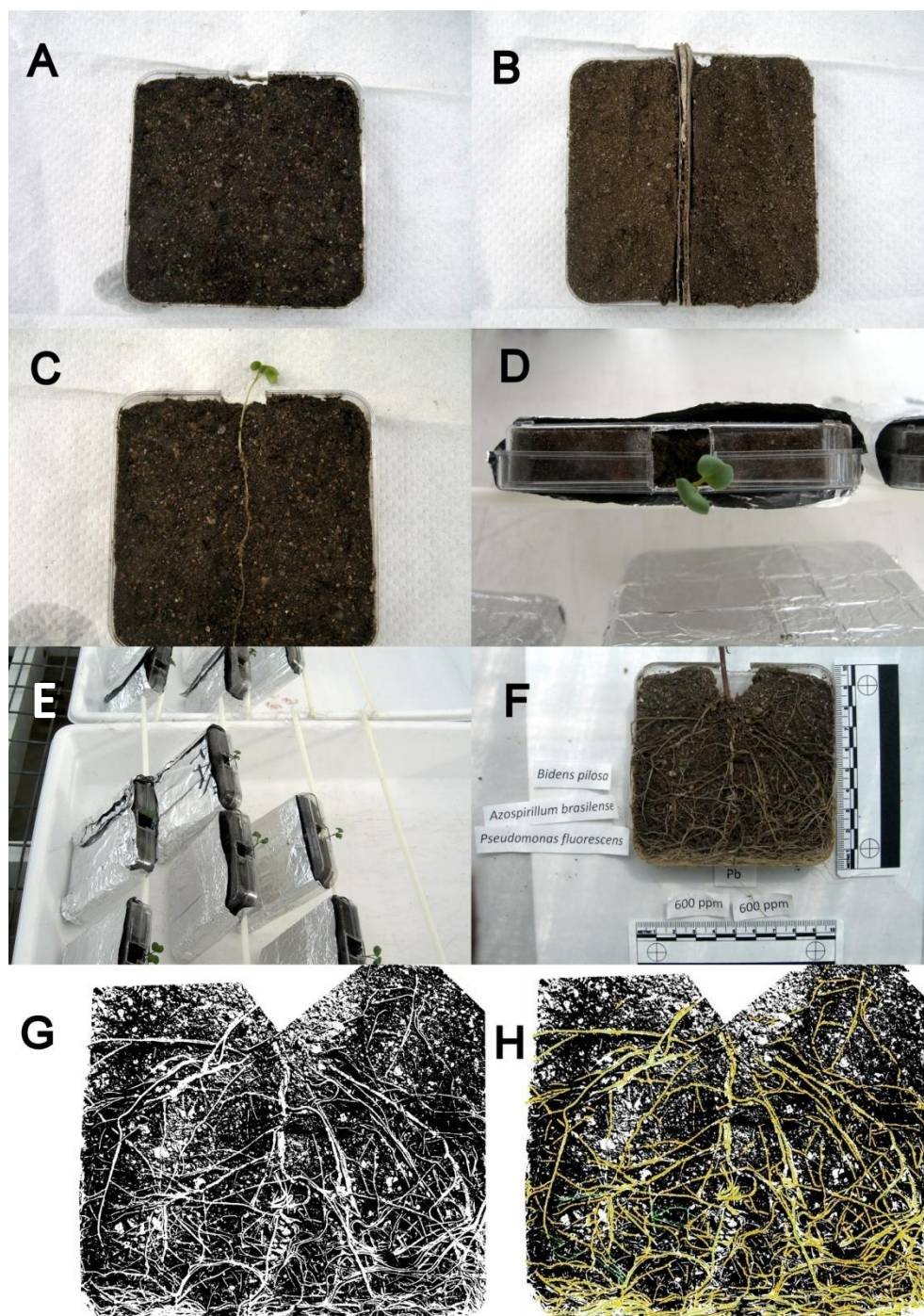
4.2.6. Determinación de la concentración de Pb en órganos vegetales de plantas sometidas a distintos tratamientos en rizocajas

Las concentraciones de Pb en los órganos de las plantas se determinaron utilizando una extracción con ácido clorhídrico al 20% y ácido nítrico puro, cada muestra se analizó por triplicado (Bermudez et al., 2009). En primer lugar, 3 g PS de cada órgano por separado (parte aérea y raíz) se llevaron a mufla a 450 ° C durante cuatro horas. Luego, las cenizas se suspendieron en 2,5 mL de la solución de extracción (HCl al 20% y HNO₃ puro (3:1 V/V), ambos de grado analítico. Después de 4 h, la solución se filtró y se analizó usando un espectrofotómetro de absorción atómica de llama (Perkin-Elmer AA3110) para medir la concentración de Pb.

4.2.7. Control de calidad

Como control de calidad se utilizaron blancos y materiales certificados. Los mismos fueron preparados de la misma manera que las muestras y se midieron cada 10 determinaciones. El material certificado utilizado fue "CTA-OTL-1" (hojas de tabaco oriental, Instituto de Química y Tecnología Nuclear, OIEA). Los porcentajes de recuperación para el material certificado vegetal fueron de 89 ± 4 % para Pb, 92 ± 1 % para Cu, 90 ± 1 % para Co, 91 ± 4 % para Ni, 90 ± 5 % para Fe, 91 ± 3 % para Zn, y 90 ± 2 % para Mn, estos son porcentajes promedio y sus desvíos estándar expresados con respecto al valor declarado y teniendo en cuenta todas las determinaciones realizadas en dicho material a lo largo de la tesis completa. Se encontró que los coeficientes de variación de los análisis entre replicados fueron inferiores al 10%.

Figura 4.1. Cultivo de *B. pilosa*, *T. minuta* y *B. juncea* en rizocajas. A) Rizocaja homogénea. B) Rizocaja heterogénea. C) Plántulas. D) Vista de una rizocaja en el momento inicial del experimento. E) Vista lateral de rizocajas inclinadas al inicio del experimento. F) Fotografía del sistema radical al momento de la cosecha. G) Primera etapa de procesamiento de una imagen del sistema radical para obtener la longitud total del mismo (binarización). H) Imagen binaria del sistema radical y trazado de vectores en Smartroot para la obtención de la longitud total de raíz.



4.2.8. Análisis de datos

4.2.8.1. Análisis estadísticos

Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilks para evaluar la distribución normal de las variables. No se encontraron datos con distribución no normal. Sin embargo se observó heteroscedasticidad, atribuida a que los distintos individuos de cada especie vegetal respondieron de manera variable a medida que estuvieron expuestos a concentraciones crecientes de Pb en suelo. No obstante este problema fue resuelto mediante la incorporación heteroscedasticidad en el modelo usando Infostat /E acoplado a R para realizar el análisis de varianza (ANOVA). Por tratarse de un diseño experimental a dos factores se evaluó primero la interacción entre los mismos. Cada vez que el ANOVA mostró efectos significativos ($p < 0,05$), se llevó a cabo una comparación por pares de medias mediante la prueba de Tukey. En los casos en que se constató interacción entre los factores, los mismos no pudieron ser analizados por separado, por lo que en estos casos se realizó una comparación de medias entre los 25 tratamientos. Cuando no hubo interacción se comparó por un lado el efecto de un factor y por otro el del segundo.

4.2.8.2. Factores de translocación y fitoextracción de plomo

Se calculó el factor de translocación desde la raíz a la parte aérea (FT R-A), utilizando la relación de la concentración de Pb en raíces y parte aérea de cada planta [$FT\ R-A = C_{a\acute{e}rea} / C_{ra\acute{i}z}$] (Bu-Olayan y Thomas, 2009). Para obtener el valor de extracción total de plomo por órgano se multiplicó la concentración de Pb encontrada en cada órgano por la biomasa seca producida por planta en ese órgano. Para obtener el valor de extracción total de plomo por planta se sumó la extracción total de la raíz más la extracción total de la parte aérea.

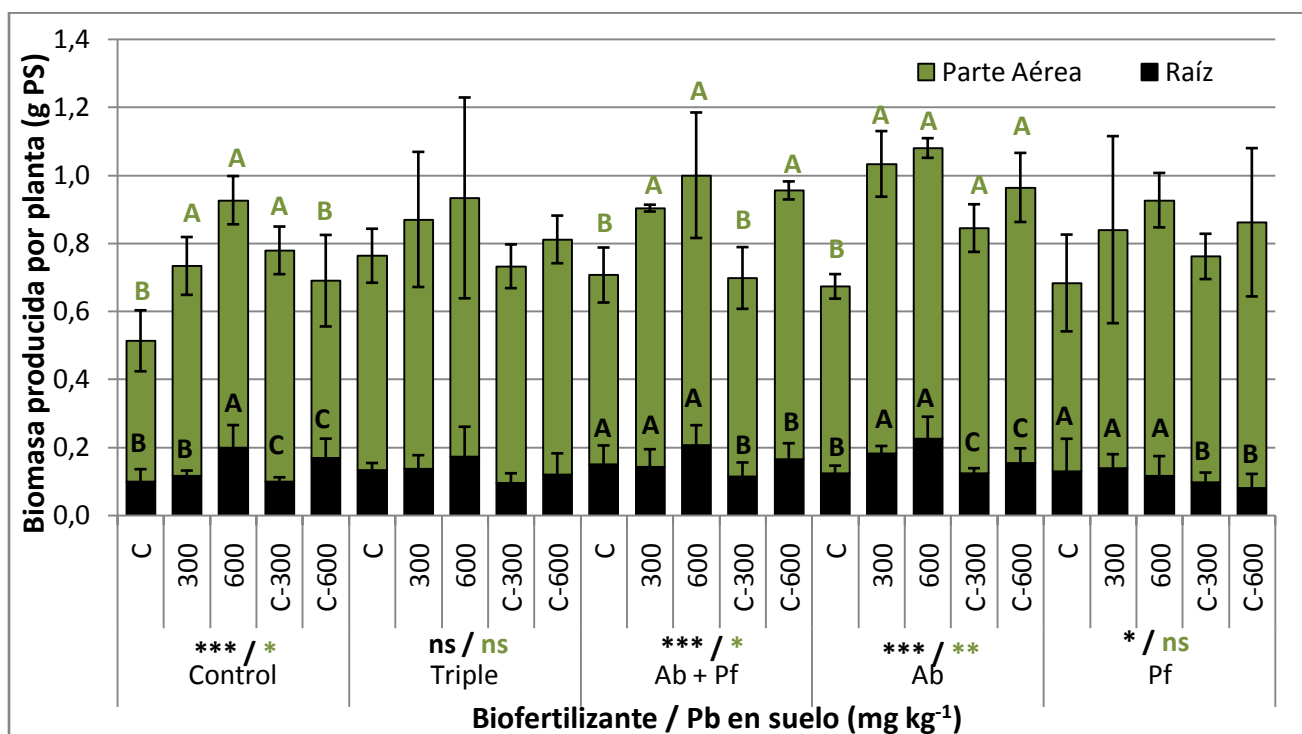
4.3. Resultados

4.3.1. Producción de Biomasa

En la Figura 4.2. se presentan los resultados de biomasa aérea y radical producidas por planta en *T. minuta*. No se encontró interacción estadística entre los factores, por lo cual

fueron analizados por separado. El uso de los biofertilizantes utilizados no incrementó significativamente la producción de biomasa aérea o radical en esta especie. Sin embargo, se observó un incremento estadísticamente significativo de la biomasa aérea relacionado con la presencia de Pb en suelo (independientemente de la concentración del metal) comparado con el tratamiento control. También se encontró un incremento en la biomasa de la raíz relacionado con la concentración de Pb en suelo, siendo máximo para el tratamiento de 600 mg kg⁻¹PS.

Figura 4.2. Efecto de la aplicación de biofertilizantes y de la concentración de Pb en suelo sobre el desarrollo de la biomasa aérea y radical por planta en *Tagetes minuta*.

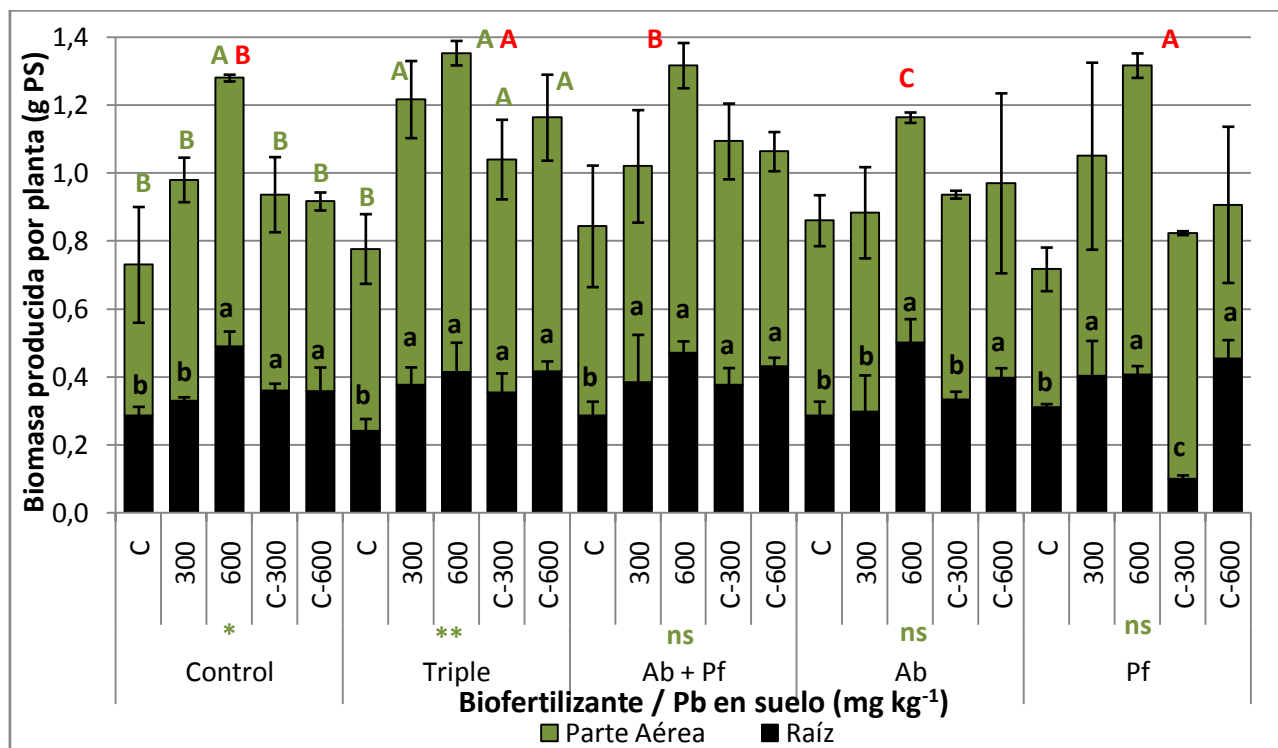


Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de Pb en suelo dentro de cada tratamiento de biofertilizante con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***). La aplicación de biofertilizantes no introdujo diferencias significativas. El color de las letras indica la parte de la planta considerada.

En la Figura 4.3. se exponen los resultados de biomasa aérea y radical producida por planta en la especie *B. pilosa*. No se encontró interacción estadística entre los factores cuando se analizó la biomasa aérea, por lo cual los resultados fueron analizados por separado. Solo el uso del biofertilizante Triple y Pf incrementó significativamente la producción de biomasa aérea en esta especie cuando la misma crece en suelos con 600 mg Pb kg⁻¹ PS, con aumentos promedio del 25%. Por otro lado se observó que el contenido de

Pb en suelo introdujo diferencias significativas en la biomasa aérea dentro de los tratamientos Control y Triple. La biomasa aérea alcanzó un valor máximo en el tratamiento de Pb en suelo con 600 mg kg⁻¹PS. Al analizar la biomasa radical se encontró interacción estadística, por lo que los factores se estudiaron en conjunto. En general la biomasa radical de *B. pilosa* no se vio incrementada por el uso de biofertilizantes, aunque cabe destacar que cuando el contenido de Pb en suelos fue de 300 mg kg⁻¹ PS los tratamientos Triple y Ab+Pf presentaron los valores más elevados de biomasa radical en esta especie. Se observó un incremento estadísticamente significativo de la biomasa aérea debido a la presencia de Pb en suelo a las dos concentraciones estudiadas en comparación con el control.

Figura 4.3. Efecto de la aplicación de biofertilizantes y de la concentración de Pb en suelo sobre el desarrollo de la biomasa aérea y radical por planta en *Bidens pilosa*.

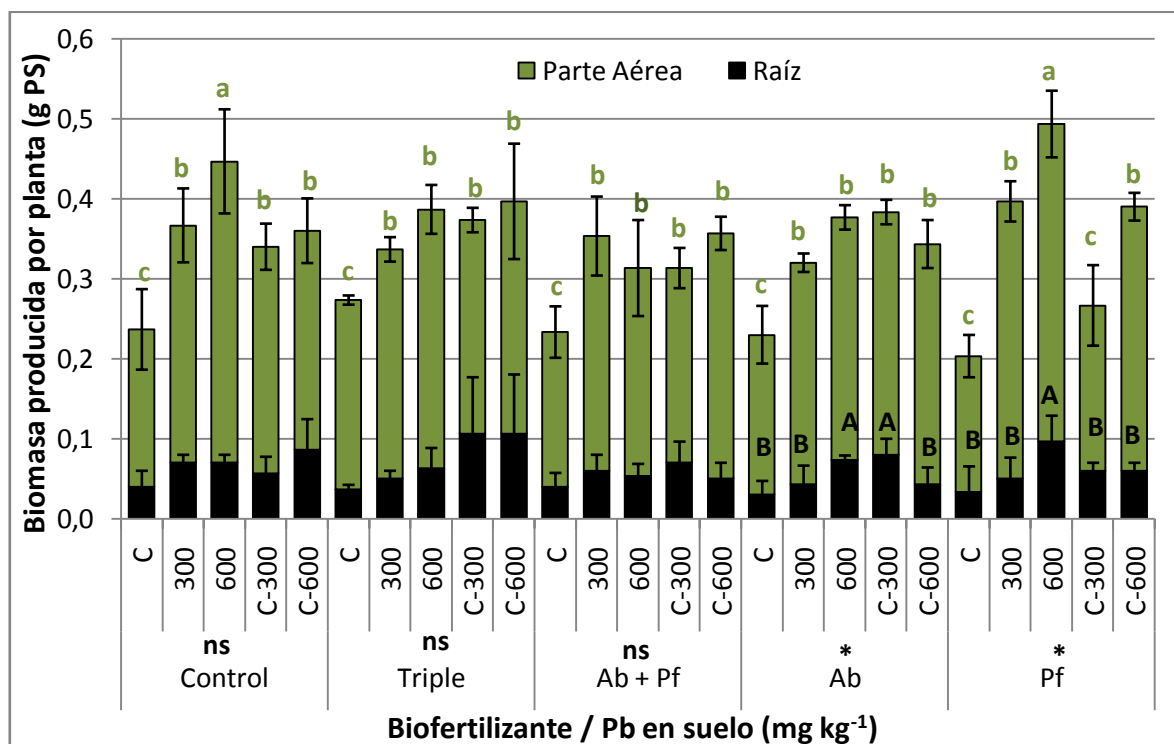


Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,001$ para la biomasa radical y $p < 0,01$ (**) o $p < 0,05$ (*) para la biomasa aérea. ns: no significativo. Las letras mayúsculas muestran los resultados de ANOVA cuando no hay interacción entre los factores, comparandose la biomasa aérea entre los tratamientos de suelo dentro de un mismo biofertilizante. Solo para el tratamiento de 600 mg kg⁻¹ se encontraron diferencias entre los tratamientos de biofertilizantes ($p < 0,01$), se lo indica con letras rojas. Las letras minúsculas indican los resultados de ANOVA cuando hay interacción (biomasa radical). El color de las letras indica la parte de la planta considerada.

Para *B. juncea* se presentan en la Figura 4.4. los resultados de biomasa aérea y radical en los distintos tratamientos. Se encontró interacción estadística entre los factores al

analizar la producción de biomasa aérea, por lo cual fueron analizados en conjunto. Considerando la aplicación de cualquiera de los biofertilizantes, se observó en todos los casos un incremento de la biomasa aérea a medida que aumentó el contenido de Pb en suelo, encontrándose los valores más elevados para el tratamiento de 600 mg kg⁻¹ PS de Pb en suelo sin aplicar biofertilizantes (Control) y con la aplicación de Pf, no obstante la biomasa radical no se vio incrementada por el uso de los mismos. Se observó un incremento estadísticamente significativo de la biomasa aérea en cualquiera de los tratamientos con Pb en suelo en comparación con el control. También se encontró un incremento en la biomasa de la raíz para el tratamiento de 600 mg kg⁻¹ PS de Pb en suelo, aunque esta tendencia solo fue significativa cuando se utilizaron los biofertilizantes Ab y Pf.

Figura 4.4. Efecto de la aplicación de biofertilizantes y de la concentración de Pb en suelo sobre el desarrollo de la biomasa aérea y radical por planta en *Brassica juncea*.

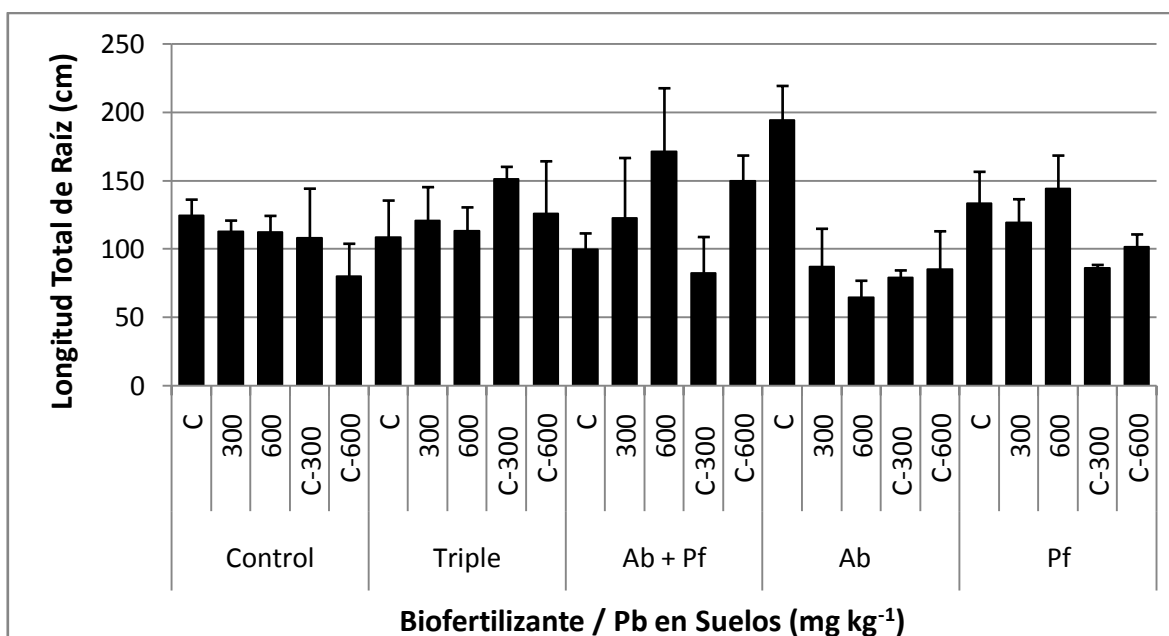


Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,01$ para la biomasa aérea y $p < 0,05$ (*) para la biomasa radical; ns: no significativo. Las letras mayúsculas muestran los resultados de ANOVA cuando no hay interacción entre los factores, comparándose la biomasa radical entre los tratamientos de suelo dentro de un mismo biofertilizante. No se encontraron diferencias entre los tratamientos de biofertilizantes dentro de cada concentración de Pb en suelo. Las letras minúsculas indican los resultados de ANOVA cuando hay interacción (biomasa aérea). El color de las letras indica la parte de la planta considerada.

4.3.2. Crecimiento radical

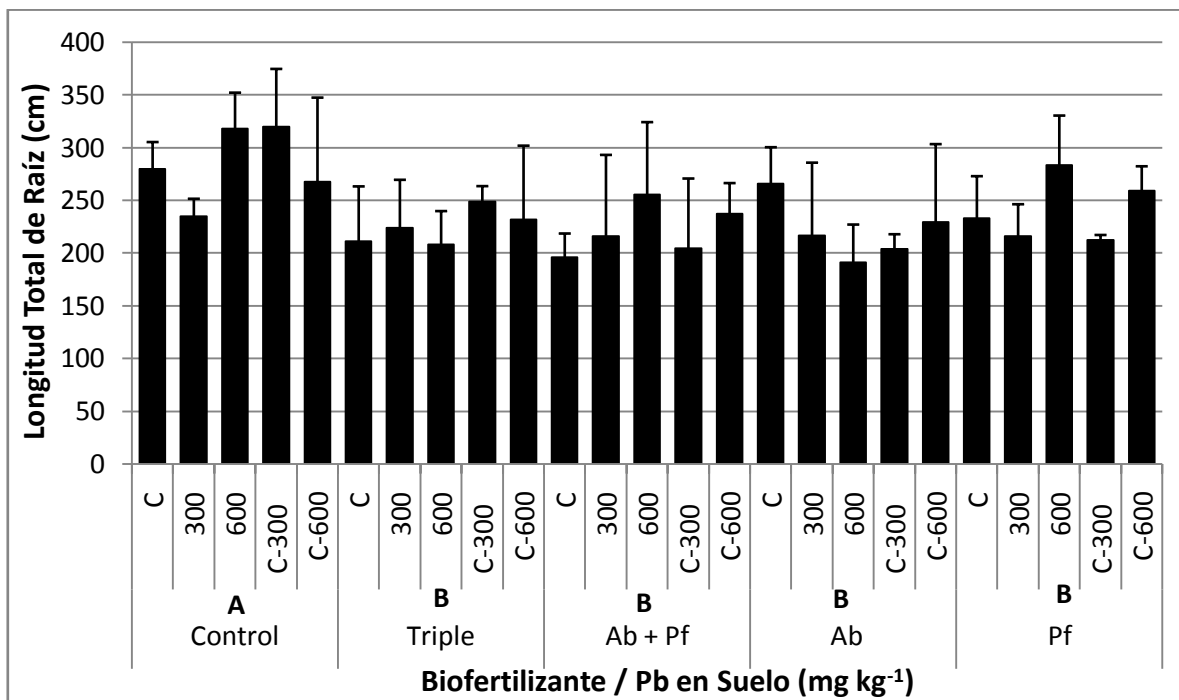
En las Figuras 4.5, 4.6 y 4.7 se presentan los resultados encontrados para la longitud total de raíz por planta en las tres especies estudiadas (*Tagetes minuta*, *Bidens pilosa* y *Brassica juncea*, respectivamente). En ninguno de los casos la concentración de Pb en suelo tuvo efecto significativo sobre la longitud radical. Esto muestra que las tres especies son muy tolerantes a la exposición a Pb. La aplicación de cualquiera de los biofertilizantes no produjo cambios significativos en la longitud radical de *T. minuta*. En el caso de *B. pilosa*, se observó una reducción significativa de dicha variable al aplicar cualquiera de los biofertilizantes. *Brassica juncea* también mostró una reducción de la raíz debida al uso de biofertilizantes, a excepción del biofertilizante Triple, con el que las plantas mostraron valores de longitud radical que no difirieron significativamente del control.

Figura 4.5. Efecto de la aplicación de biofertilizantes y de la concentración de Pb en suelo sobre el desarrollo radical en términos de longitud total en *Tagetes minuta*.



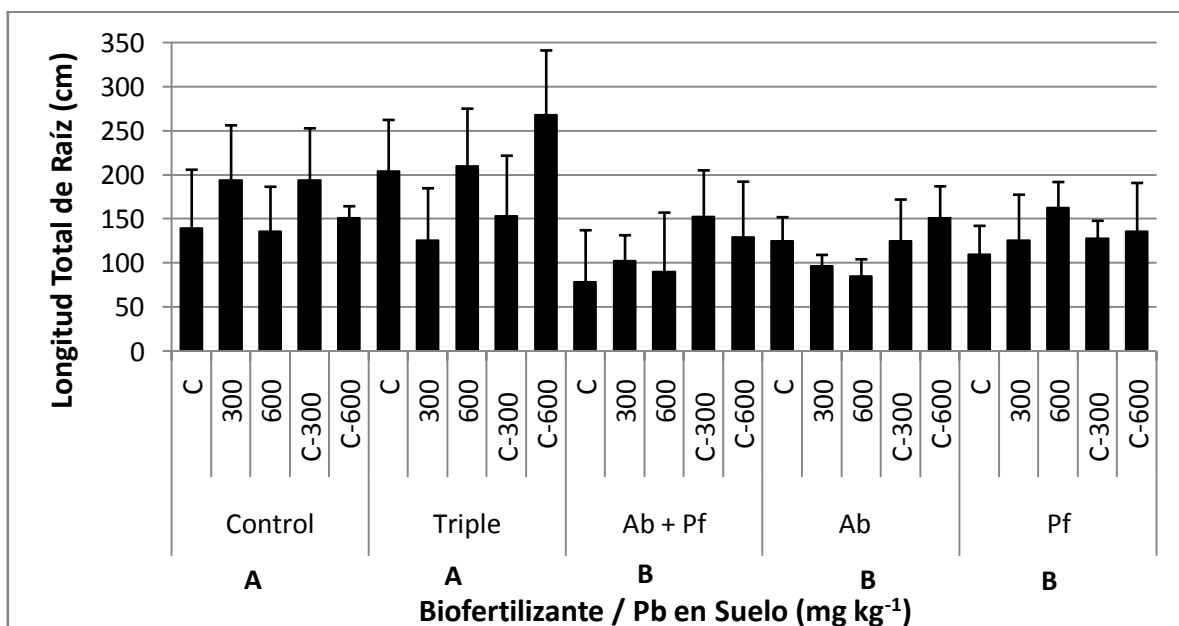
No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Figura 4.6. Efecto de la aplicación de biofertilizantes y de la concentración de Pb en suelo sobre el desarrollo radical en términos de longitud total en *Bidens pilosa*.



Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ para el factor “Biofertilizante, el factor “Pb en suelo” no presentó diferencias significativas.

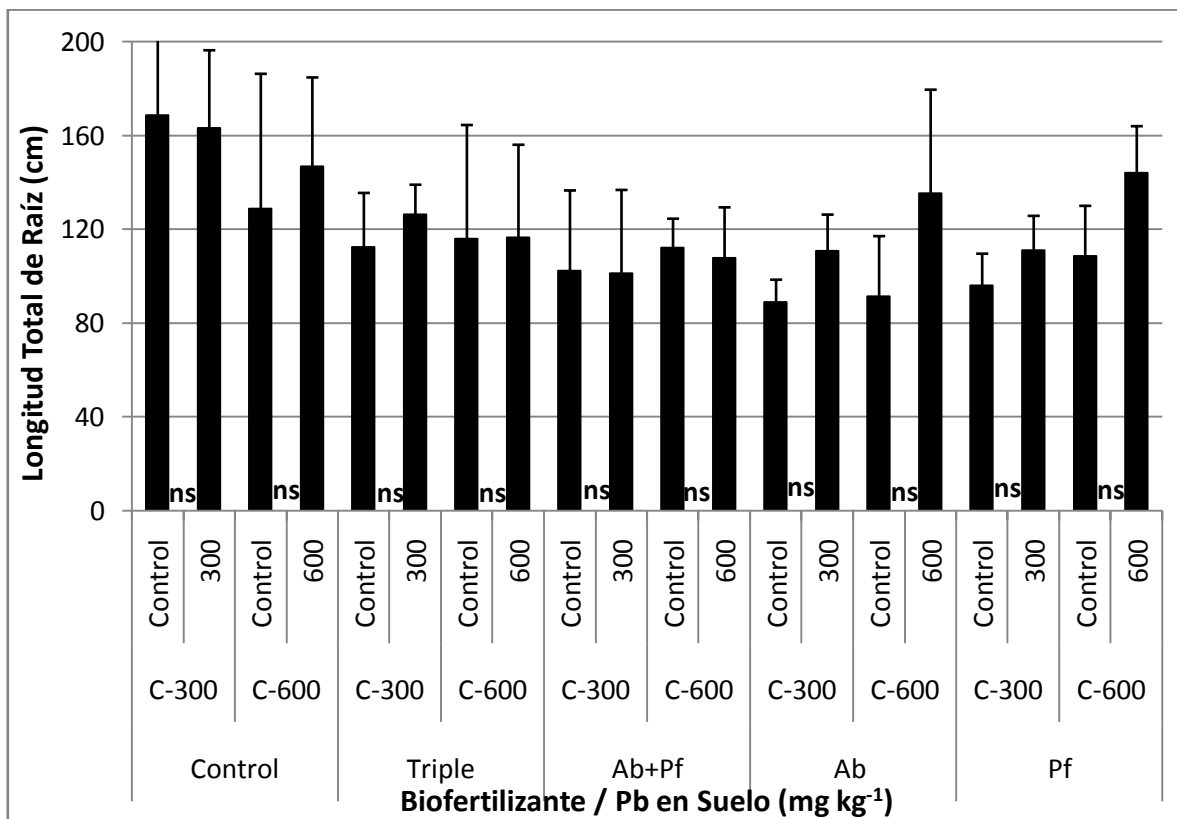
Figura 4.7. Efecto de la aplicación de biofertilizantes y de la concentración de Pb en suelo sobre el desarrollo radical en términos de longitud total de *Brassica juncea*.



Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,001$ para el factor “Biofertilizante, el factor “Pb en suelo” no presentó diferencias significativas.

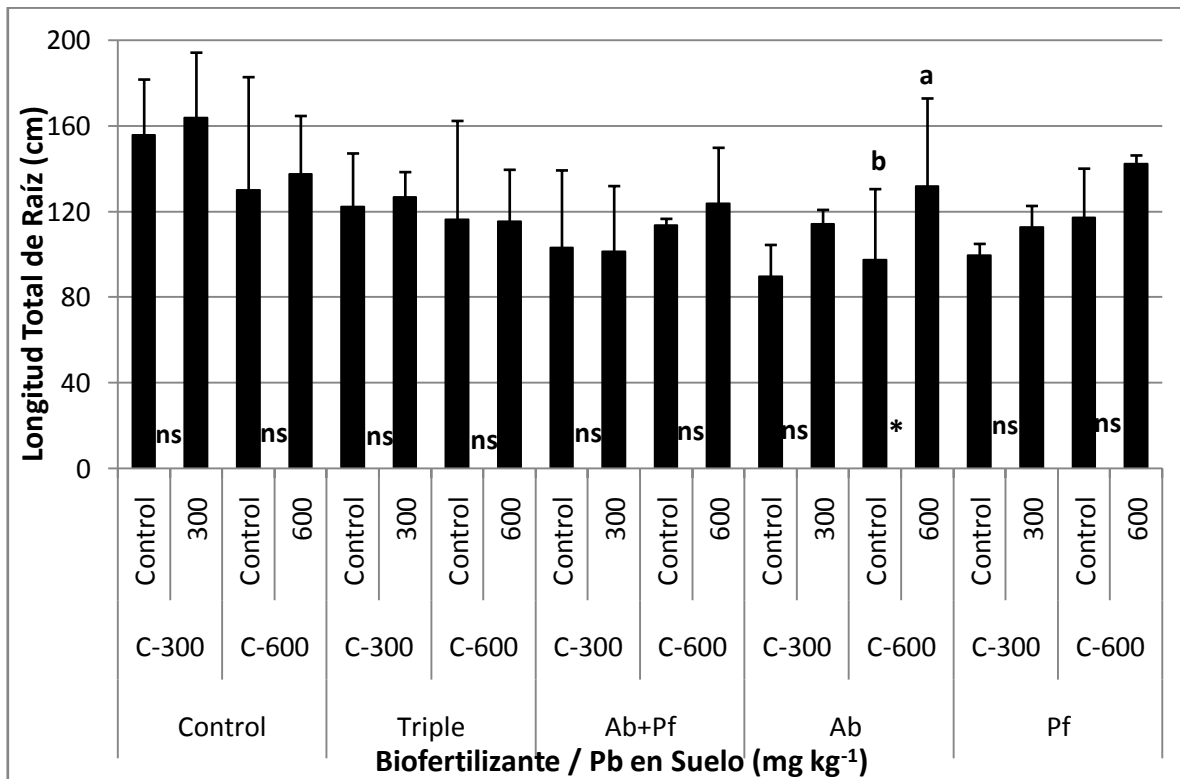
Con la finalidad de estudiar posibles preferencia del sistema radical por suelos limpios o contaminados con Pb (quimiotropismo) ,se realizaron experimentos en cajas de cultivo heterogéneas, donde la mitad de la caja contenía suelo control y la otra mitad suelo enriquecido con 300 o 600 mg kg⁻¹ PS de Pb en suelo. Los análisis estadísticos no mostraron interferencia entre los factores y tampoco efectos significativos por el uso de biofertilizantes. Por ello los datos se particionaron según el biofertilizante empleado en cada experimento de acuerdo a las combinaciones heterogéneas, a fin de comparar únicamente los compartimientos contaminado y control de las cajas. En las Figuras 4.8., 4.9. y 4.10. se presentan los resultados para la longitud de raíz de *T. minuta*, *B. pilosa* y *B. juncea* respectivamente, para los tratamientos en concentraciones heterogéneas de Pb en suelo. Los análisis estadísticos mostraron que, en general, no hubo preferencias en las raíces de ninguna de las tres especies por suelos limpios o contaminados con Pb, mostrando que para estas especies la presencia o no de Pb en suelo no altera el comportamiento radical durante el desarrollo de las mismas. Este resultado fue el mismo para las distintas concentraciones de Pb en suelo y para todos los biofertilizantes estudiados. Sólo se encontraron diferencias significativas para *B. pilosa* y *B. juncea* cuando se aplicó el biofertilizante Ab en la combinación más extrema (Control – 600 mg kg⁻¹ PS de Pb en suelo), siendo mayor la longitud de raíz en el lado contaminado de la caja (incremento de un 26% y 20% para cada especie respectivamente). Esto podría indicar que en determinadas condiciones estas especies muestren un tropismo positivo hacia los micro-sitios del suelo que presentan mayor concentración del metal. Este fenómeno podría estar relacionado con la interacción en la rizosfera de estas especies vegetales con *Azospirillum brasilense*.

Figura 4.8. Longitud radical de *Tagetes minuta* en relación al uso de biofertilizantes cuando crecen en suelos con concentraciones heterogéneas y crecientes de Pb en suelo.



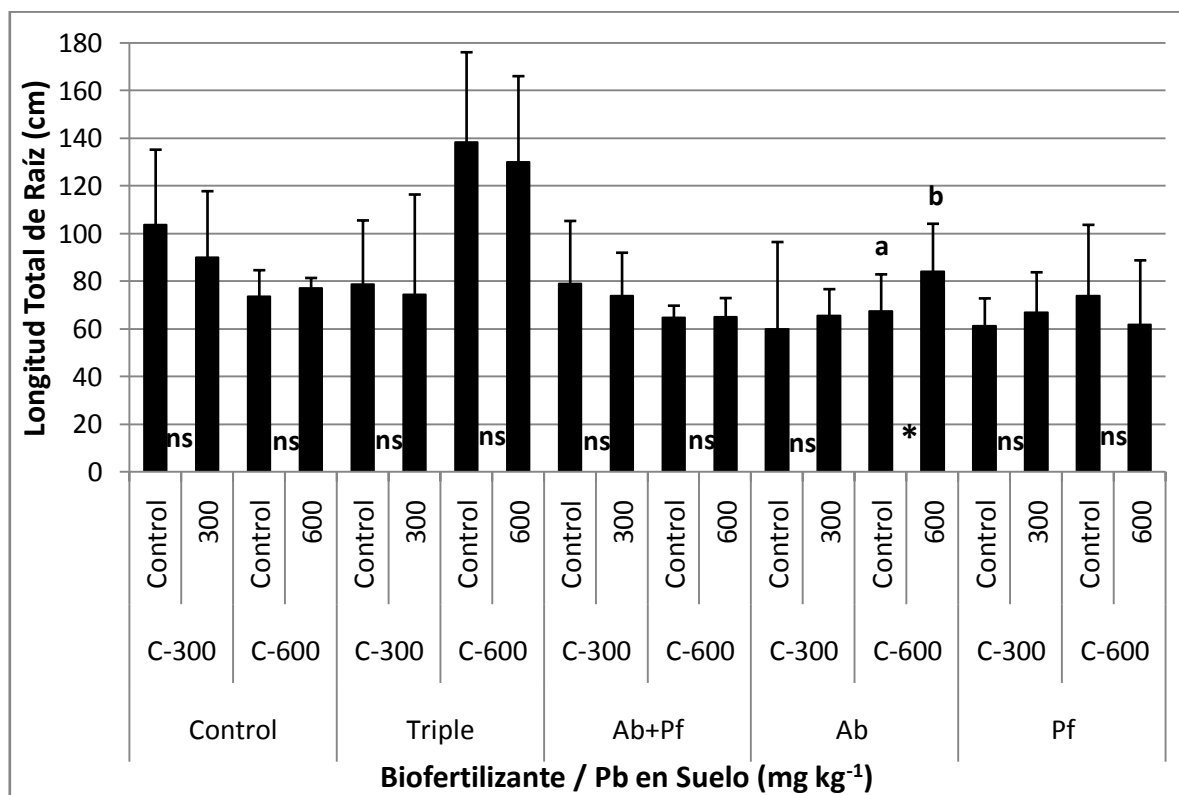
No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Figura 4.9. Longitud radical de *Bidens pilosa* en relación al uso de biofertilizantes cuando crecen en suelos con concentraciones heterogéneas y crecientes de Pb en suelo.



ns: diferencias no significativas. *: diferencias significativas con $p < 0,05$.

Figura 4.10. Longitud radical de *Brassica juncea* en relación al uso de biofertilizantes cuando crecen en suelos con concentraciones heterogéneas y crecientes de Pb en suelo.



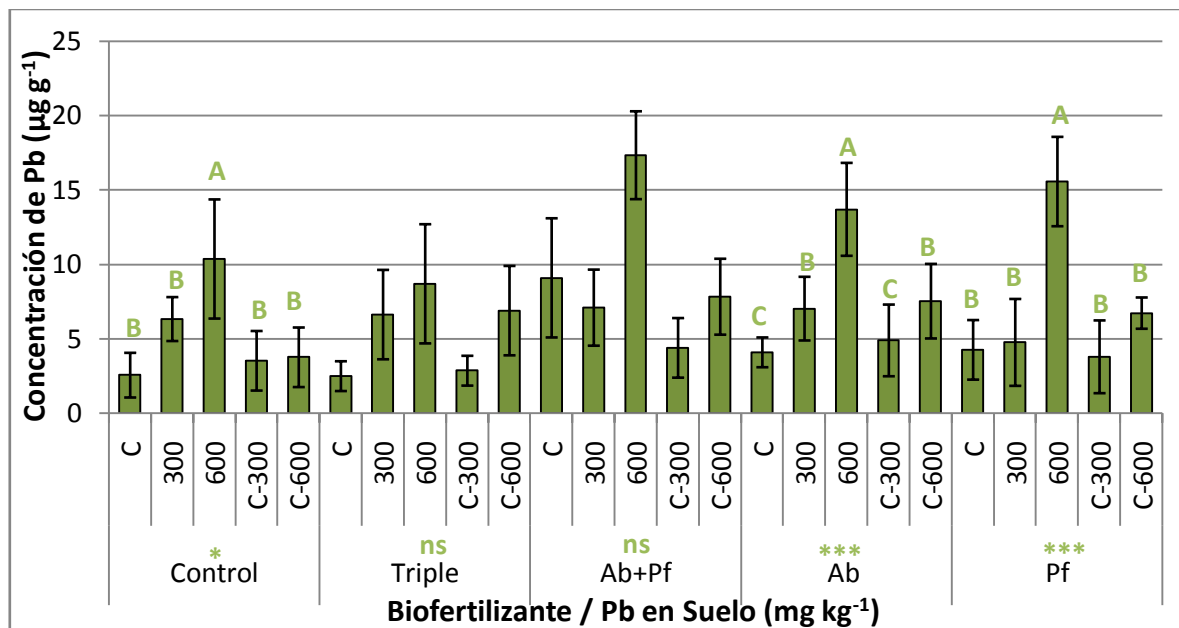
ns: diferencias no significativas. *: diferencias significativas con $p < 0,05$.

4.3.3. Concentración de plomo en la parte aérea de plantas de *T. minuta*, *B. pilosa* y *B. juncea*

Los resultados para la acumulación de Pb en tejidos aéreos de *T. minuta*, *B. pilosa* y *B. juncea* se presentan en las Figuras 4.11., 4.12., y 4.13. respectivamente. En el caso de *T. minuta*, el uso de biofertilizantes no produjo ningún efecto significativo sobre la acumulación de plomo en la parte aérea. El aumento en la concentración de Pb en suelo produjo en dicha especie un incremento en la acumulación aérea en los tratamientos Control, Ab y Pf. Para *B. pilosa*, se encontró interacción estadística entre los factores estudiados; el uso del biofertilizante Triple incrementó la concentración de Pb en los tejidos aéreos cuando fue cultivada en los suelos C y C-300, mientras que el uso del biofertilizante Pf produjo un decaimiento de la acumulación de Pb por la planta cuando fue cultivada en todos los suelos, excepto en el de mayor concentración de Pb. Para la especie *B. juncea* no se detectaron diferencias significativas en la acumulación aérea del metal por el uso de

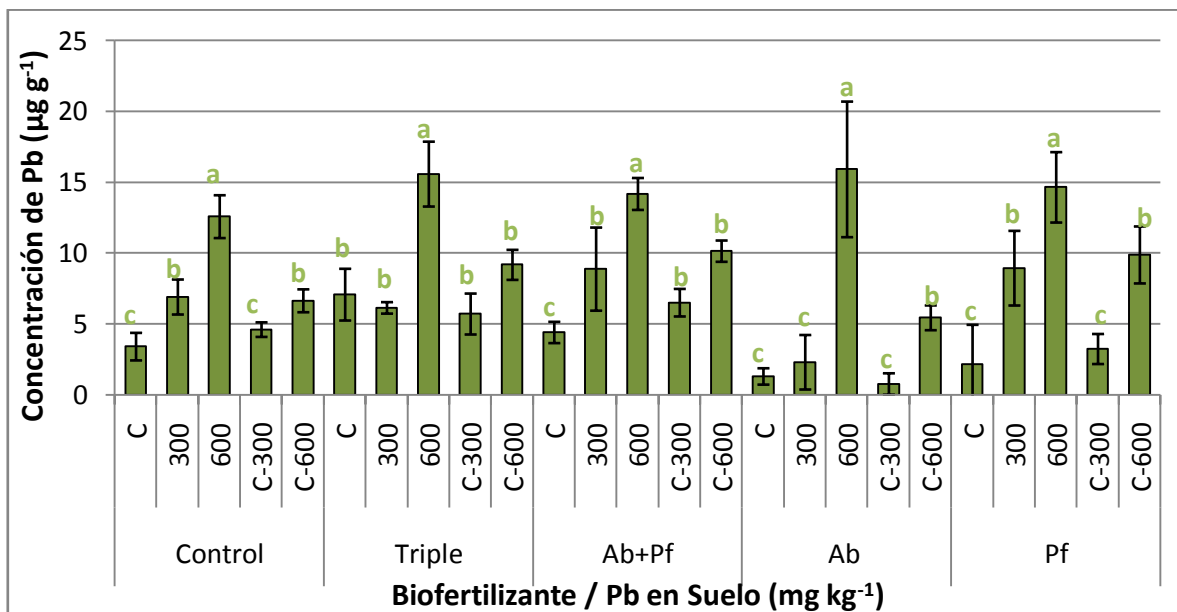
biofertilizantes, ni por las diferentes concentraciones de Pb en suelo, aunque puede observarse una tendencia de menor acumulación en el uso del biofertilizante Pf.

Figura 4.11. Acumulación de Pb en tejidos aéreos de *Tagetes minuta* en función de la concentración del metal en suelo y de la aplicación de biofertilizantes comerciales.



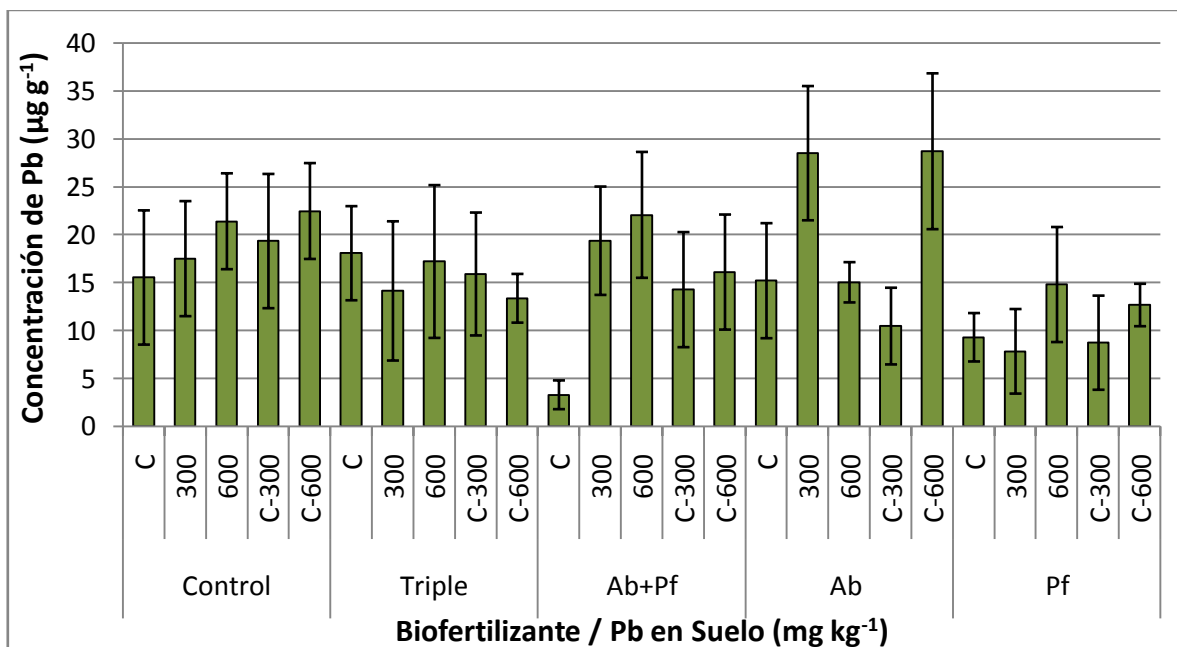
Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (*) o $p < 0,001$ (***) entre las concentraciones halladas en los diferentes tratamientos de suelo dentro de cada tratamiento de biofertilizante; ns: no significativo. Los tratamientos de biofertilizantes no introdujeron diferencias significativa dentro de cada nivel de Pb en suelo.

Figura 4.12. Acumulación de Pb en tejidos aéreos de *Bidens pilosa* en función de la concentración del metal en suelo y de la aplicación de biofertilizantes comerciales.



Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,001$ para la interacción entre los factores “Biofertilizante” y “Pb en Suelo”.

Figura 4.13. Acumulación de Pb en tejidos aéreos de *Brassica juncea* en función de la concentración del metal en suelo y de la aplicación de biofertilizantes comerciales.

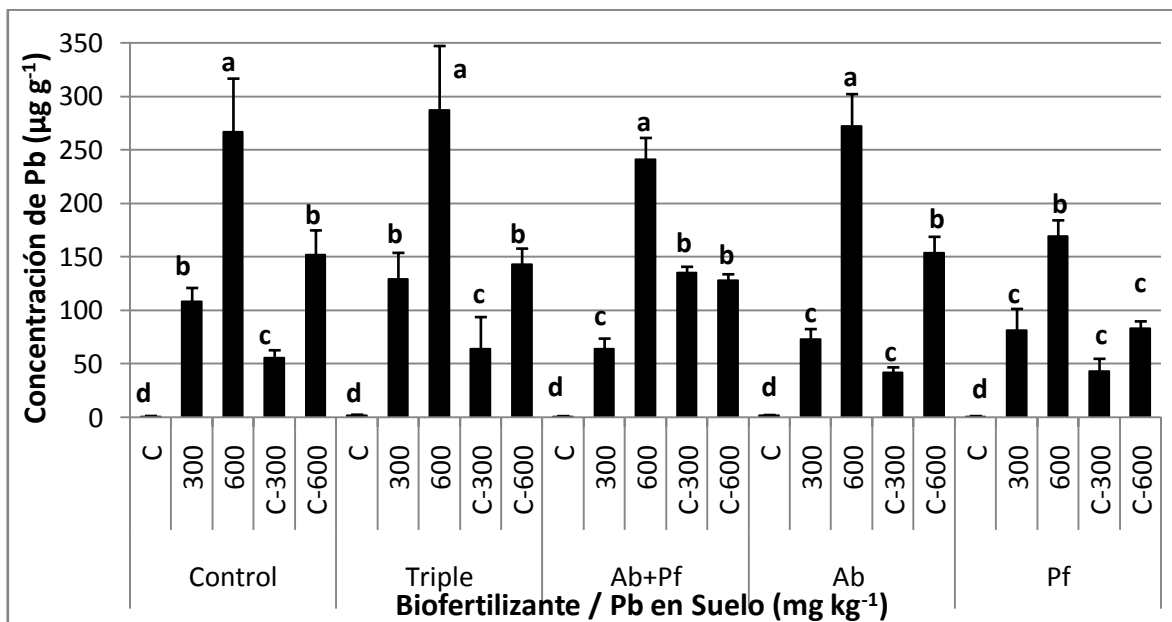


No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

4.3.4. Concentración de Pb en raíces de plantas de *T. minuta*, *B. pilosa* y *B. juncea*

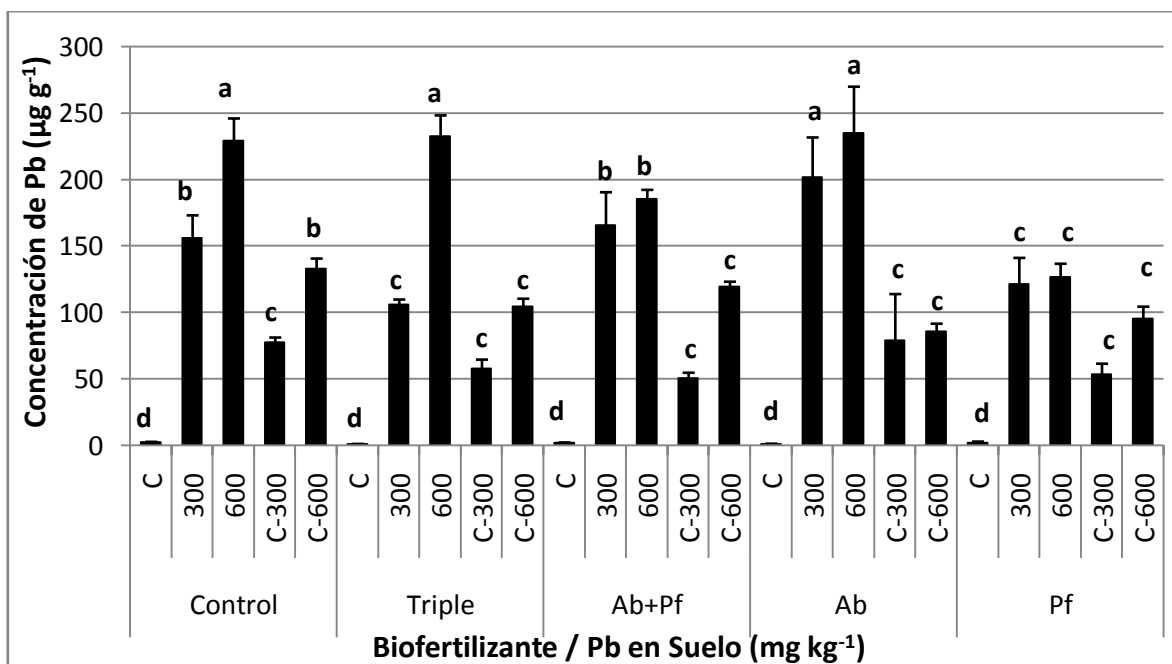
Los resultados para la acumulación de Pb en raíces de *T. minuta*, *B. pilosa* y *B. juncea* se representan en las Figuras 4.14., 4.15., y 4.16. respectivamente. Los resultados para los factores “biofertilizante” y “Pb en suelo” mostraron interacción estadística, no obstante el patrón de acumulación de Pb en raíz muestra una relación más evidente con el Pb en suelo que con la aplicación de biofertilizantes, presentando niveles superiores de acumulación a medida que el suelo se encontraba más enriquecido en Pb, en las tres especies estudiadas. Para *T. minuta*, la aplicación del biofertilizante Triple no introdujo diferencias significativas en la acumulación radical de Pb con respecto al control, el biofertilizante Ab + Pf causó un incremento significativo en la acumulación del metal en el tratamiento C-300 mientras que estos mismos microorganismos por separado causaron una disminución de la acumulación radical para casi todos los niveles de Pb en suelo. En el caso de *B. pilosa* se observó una disminución en la concentración de Pb en raíces cuando se utilizaron los biofertilizantes Ab + Pf y Pf. En cuanto a *B. juncea*, los resultados muestran un incremento en la acumulación radical de Pb debido a la aplicación del biofertilizante Triple y una disminución de la misma en relación al uso de Pf.

Figura 4.14. Acumulación de Pb en raíces de *Tagetes minuta* en función de la concentración del metal en suelo y de la aplicación de biofertilizantes comerciales.



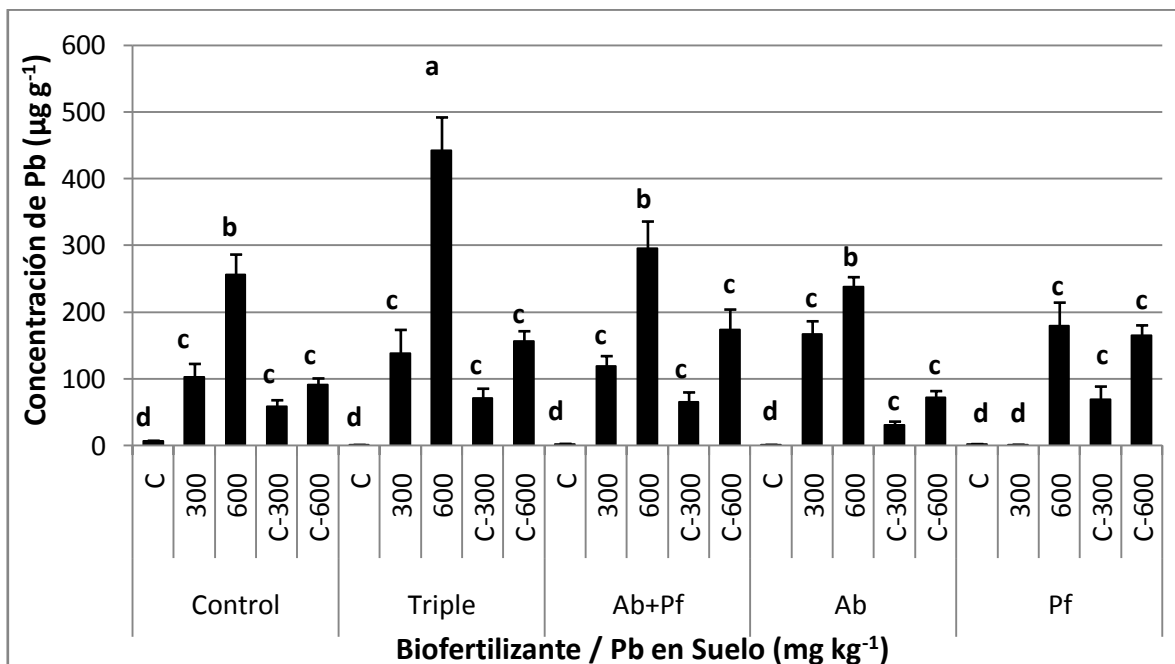
Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ para la interacción entre los factores “Biofertilizante” y “Pb en Suelo”.

Figura 4.15. Acumulación de Pb en raíces de *Bidens pilosa* en función de la concentración del metal en suelo y de la aplicación de biofertilizantes comerciales.



Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ para la interacción entre los factores “Biofertilizante” y “Pb en Suelo”.

Figura 4.16. Acumulación de Pb en raíces de *Brassica juncea* en función de la concentración del metal en suelo y de la aplicación de biofertilizantes comerciales.



Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ para la interacción entre los factores “Biofertilizante” y “Pb en Suelo”.

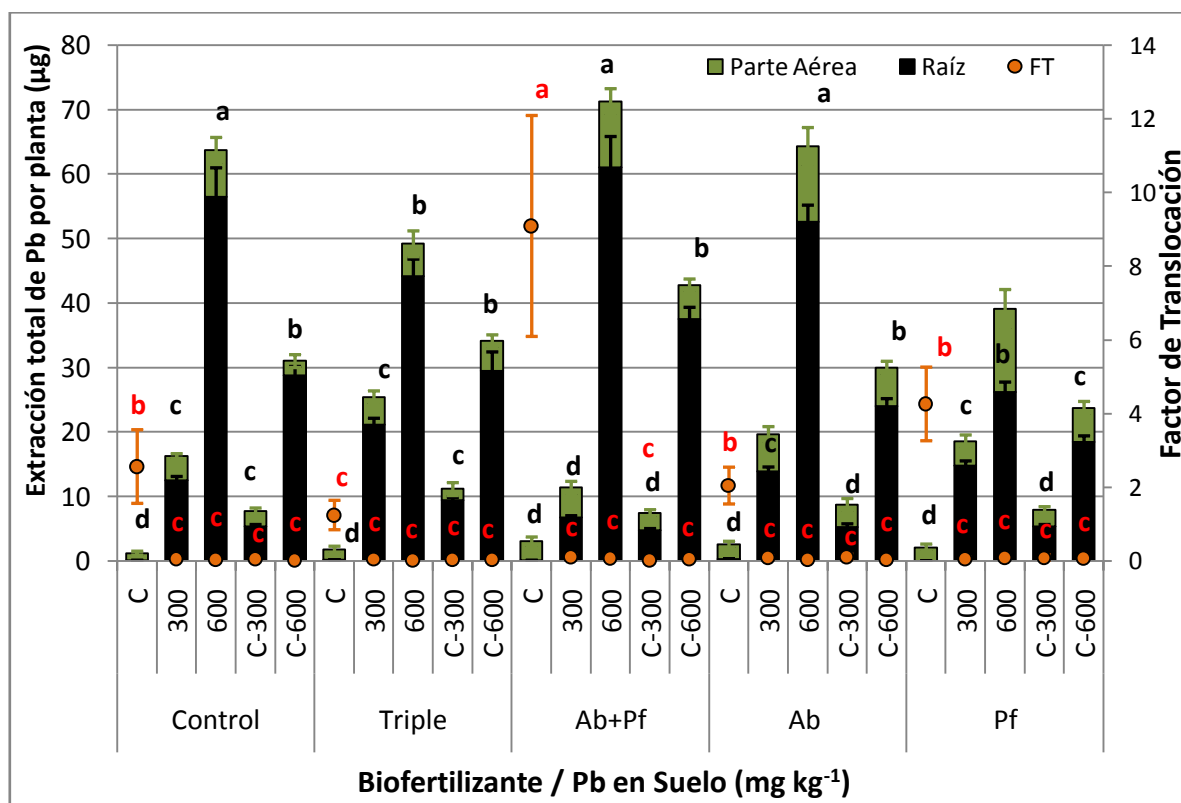
4.3.5. Extracción total de Pb por planta y factor de translocación en *T. minuta*, *B. pilosa* y *B. juncea*

En las Figuras 4.17., 4.18, y 4.19. se exponen los resultados encontrados para la extracción de Pb por planta y para los factores de translocación de *T. minuta*, *B. pilosa* y *B. juncea* respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para la extracción aérea total de Pb por planta para ninguna de las especies, mientras que en relación a la extracción total de Pb por planta en la raíz se observó interacción estadística entre los dos factores. En el análisis de la extracción total de Pb por planta (aéreo y raíz), las comparaciones estadísticas mostraron el mismo resultado que en el caso del órgano radical. En las tres especies el patrón encontrado se mostró principalmente relacionado a la concentración de Pb en suelo. No obstante, puede decirse que en *T. minuta* la extracción total se vio disminuida por el uso de los biofertilizantes Triple y Pf, mientras que para las otras dos especies esto sólo ocurrió al aplicar Pf; incluso, en el caso particular de *B. juncea*

también se observó un incremento en la extracción de Pb cuando se aplicó el biofertilizante Triple.

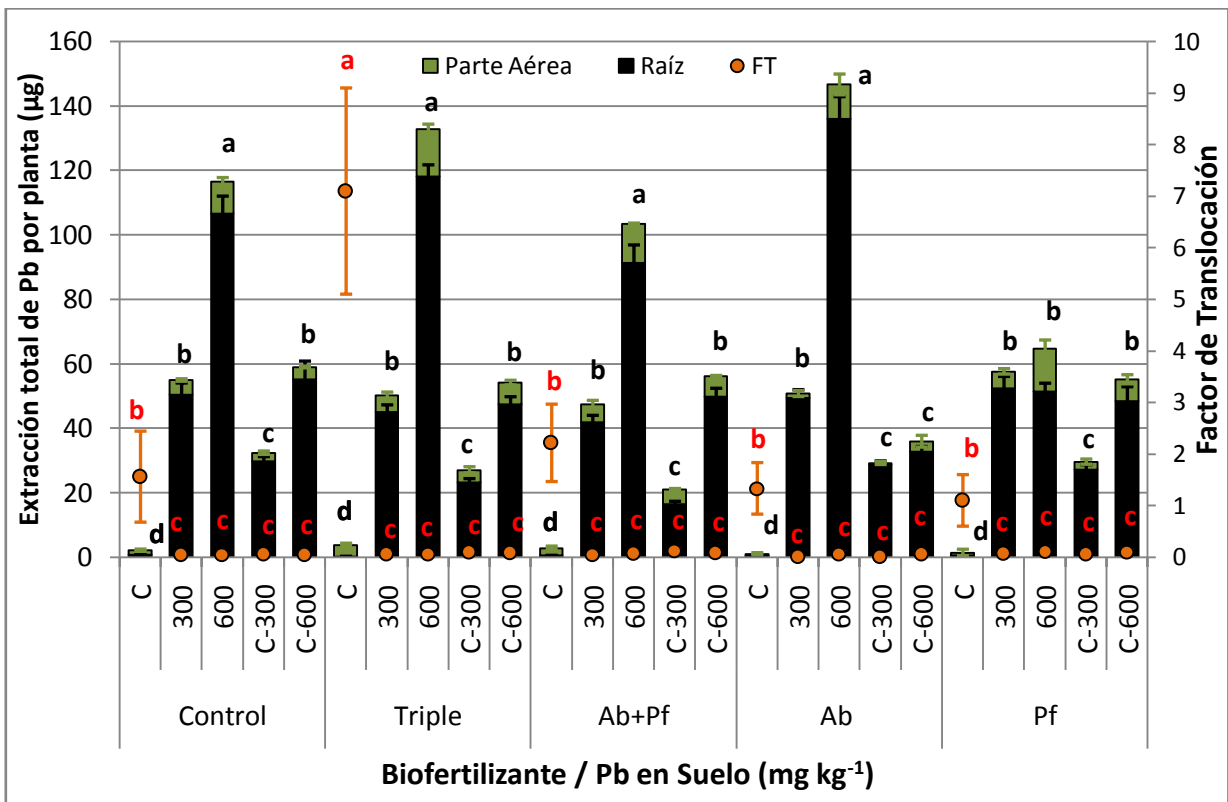
Los FT de Pb fueron superiores a la unidad siempre y cuando el suelo no se encontrara enriquecido con el metal. El Pb incorporado por las plantas se acumuló fundamentalmente en las raíces cuando el contenido del mismo en suelo fue incrementándose. El uso de biofertilizantes no logró revertir esta situación en suelos enriquecidos con Pb en la mayoría de los casos, con excepción del suelo con 300 mg kg⁻¹ PS de Pb para la especie *B. juncea*. Es importante destacar que el uso de biofertilizantes sí incremento varias veces el FT de Pb en los cultivos con suelos no contaminados (Ab + Pf para *T. minuta*; Triple para *B. pilosa*; triple y Ab para *B. juncea*).

Figura 4.17. Extracción aérea, radical y total de Pb por planta y factor de translocación desde la raíz a la parte aérea en *Tagetes minuta* en función de la concentración del metal en suelo y de la aplicación de biofertilizantes comerciales.



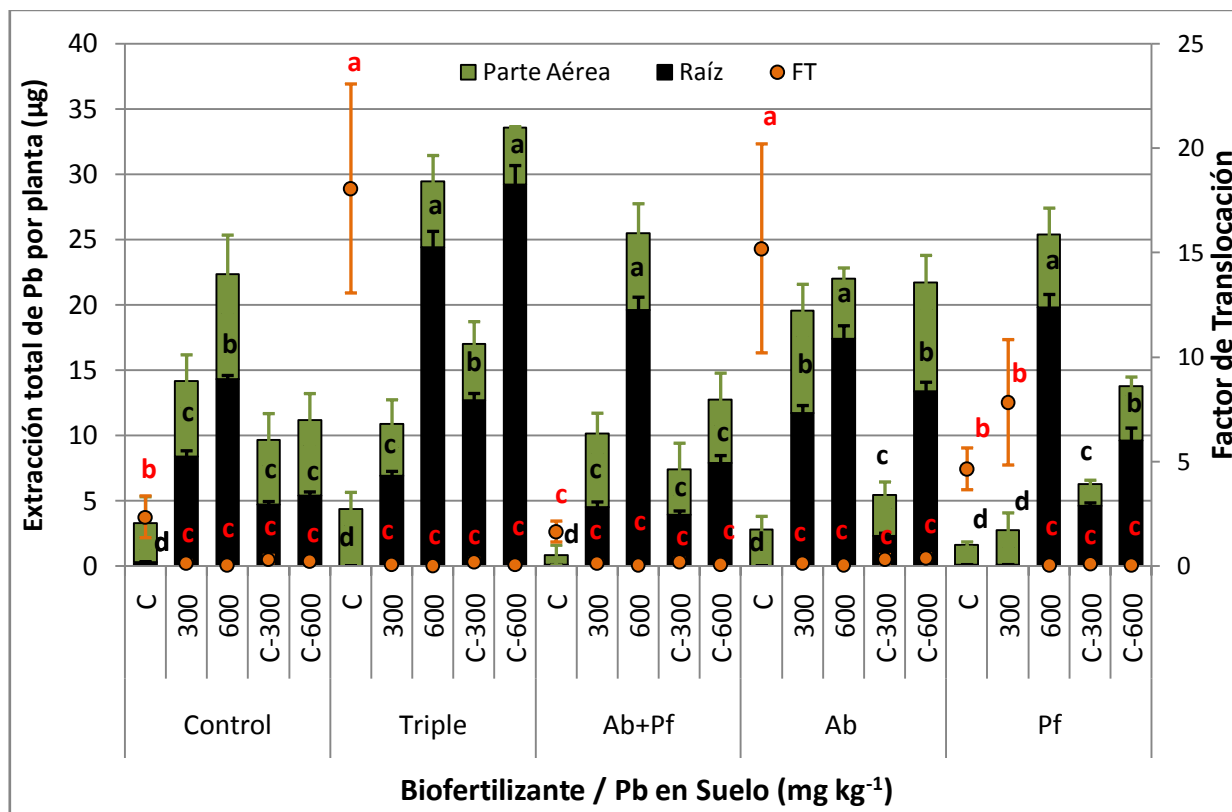
Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ para extracción total radical y para FT (ambos con interacción estadística entre los factores “biofertilizante” y “Pb en Suelo”). Los colores de las letras indican la variable comparada.

Figura 4.18. Extracción aérea, radical y total de Pb por planta y factor de translocación desde la raíz a la parte aérea en *Bidens pilosa* en función de la concentración del metal en suelo y de la aplicación de biofertilizantes comerciales.



Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ para extracción total radical y para FT (ambos con interacción estadística entre los factores “biofertilizante” y “Pb en Suelo”). Los colores de las letras indican la variable comparada.

Figura 4.19. Extracción aérea, radical y total de Pb por planta y factor de translocación desde la raíz a la parte aérea en *Brassica juncea* en función de la concentración del metal en suelo y de la aplicación de biofertilizantes comerciales.



Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ para extracción total radical y para FT (ambos con interacción estadística entre los factores “biofertilizante” y “Pb en Suelo”). Los colores de las letras indican la variable comparada.

4.4. Discusión

Sorprendentemente se observó un incremento de biomasa radical y aérea a medida que aumentó la concentración de Pb en suelo, independientemente del biofertilizante utilizado o de la especie estudiada. Estos resultados contrastan con los hallados en el Capítulo III y en la bibliografía, que indican que el incremento de Pb en suelo, debido a su fitotoxicidad, limita el desarrollo vegetal (Pourrut et al., 2011). Posiblemente la restricción espacial de la raíz sea la razón de este extraño comportamiento, ya que es el único factor que se modificó con respecto al diseño de los experimentos descritos en el Capítulo III, y que esta tendencia fue independiente del tratamiento con biofertilizantes.

La longitud de las raíces y la producción de biomasa no se vieron incrementadas por la aplicación de biofertilizantes en la medida esperada, encontrándose aumentos significativos de estas variables solo en algunos casos. Posiblemente, en un contexto de mayor disponibilidad espacial para el desarrollo de las raíces el efecto de los biofertilizantes podría haber sido más notable.

El crecimiento de la raíz en términos de longitud no mostró preferencias por suelos con Pb o sin Pb en los tratamientos heterogéneos, mostrando que las especies estudiadas tienen la capacidad de desarrollarse de la misma manera en ambos. La aplicación del biofertilizante Ab modificó este comportamiento solo cuando las diferencias de concentración de Pb en suelo eran muy marcadas (C-600) en las especies *B. pilosa* y *B. juncea*.

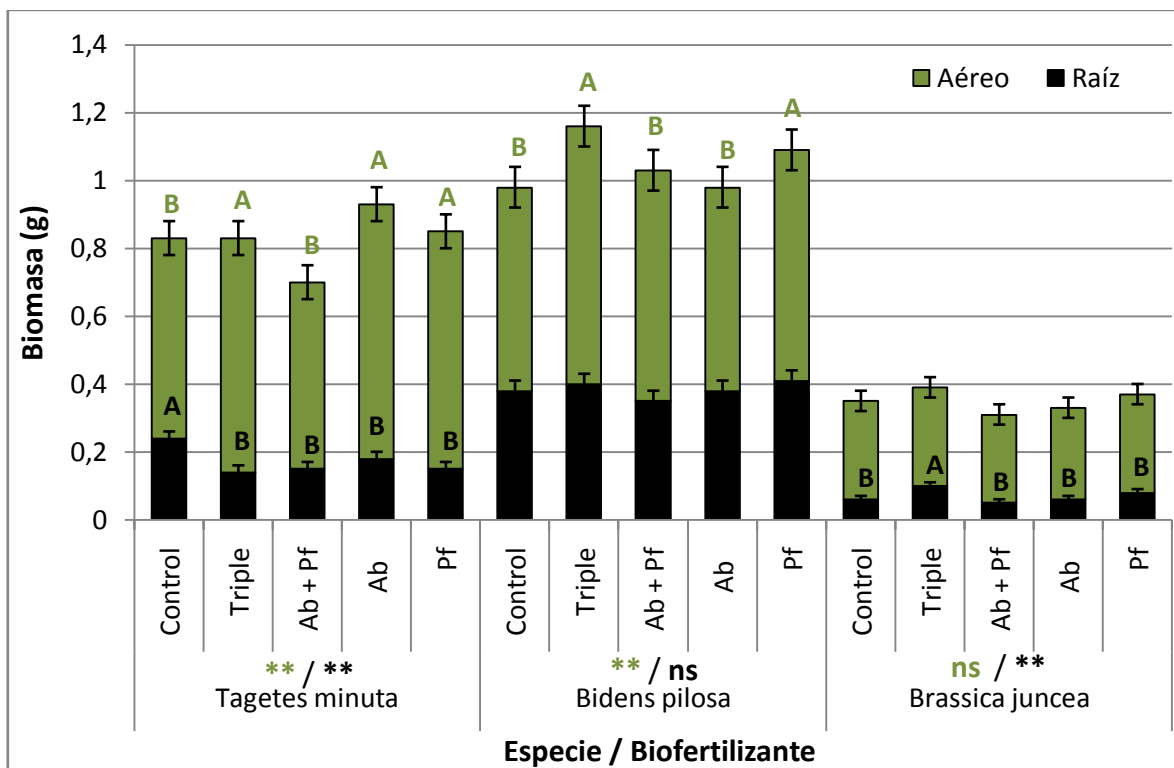
En cuanto a los niveles de Pb acumulado por las plantas, estos fueron inferiores al aplicar el biofertilizante Pf. Este es un fenómeno que otros autores habían observado previamente, aunque para otros metales pesados y con el empleo de otros biofertilizantes (Juwarkar et al., 2008; Yadav et al., 2009). No obstante, en los estudios citados, el incremento en el desarrollo de biomasa había compensado la merma en la acumulación en términos de concentración del metal, logrando así una eficiencia similar pero asegurando un mejor establecimiento y mayor supervivencia de las especies fitoextractoras en los suelos contaminados.

El experimento desarrollado en este capítulo tuvo como objetivo central determinar el efecto del uso de biofertilizantes comerciales sobre la eficiencia fitoextractora de Pb en tres especies vegetales aptas para su empleo en la fitorremediación de suelos enriquecidos con este metal; no obstante el rango de concentraciones de Pb en suelo utilizado mostró un efecto demasiado importante, superando este al de la aplicación de biofertilizantes. A fin de separar los efectos se realizó un nuevo análisis estadístico estableciendo la concentración de Pb en suelo como un factor aleatorio en lugar de considerarlo un factor fijo. De esta manera el único factor fijo del nuevo análisis fue el uso de biofertilizantes. Este análisis permitió descontar el efecto del Pb en suelo sobre las distintas variables de respuesta estudiadas en las plantas y así observar con mayor precisión el efecto de los biofertilizantes. De esta manera la Figura 4.20. muestra los resultados para la producción de biomasa aérea y radical

en las tres especies según este enfoque; la Figura 4.21. muestra los resultados para la concentración de plomo en tejidos aéreos y radicales y la Figura 4.22., para la extracción total de Pb por planta.

La aplicación de biofertilizantes en el cultivo de *T. minuta* produjo una reducción de la biomasa radical pero al mismo tiempo un incremento en la biomasa aérea. Estas alteraciones se compensaron lográndose una biomasa total por planta equivalente entre los tratamientos; aunque cabe destacar que, desde el punto de vista de la fitoextracción, una mayor biomasa aérea puede significar una mayor extracción neta del metal, aspecto que se retoma en los próximos párrafos. El desarrollo de la biomasa radical en *B. pilosa* no se vio afectado por el uso de biofertilizantes, mientras que los tratamientos Triple y Pf indujeron un aumento significativo de la biomasa aérea. La biomasa total por planta producida por las especies *T. minuta* y *B. pilosa* llegó a duplicar, y en algunos casos triplicar, la de *B. juncea*. Esto estaría indicando un potencial superior para las especies nativas seleccionadas en comparación con la de referencia. En el caso de *B. juncea* la biomasa radical se vio incrementada debido al uso del biofertilizante Triple.

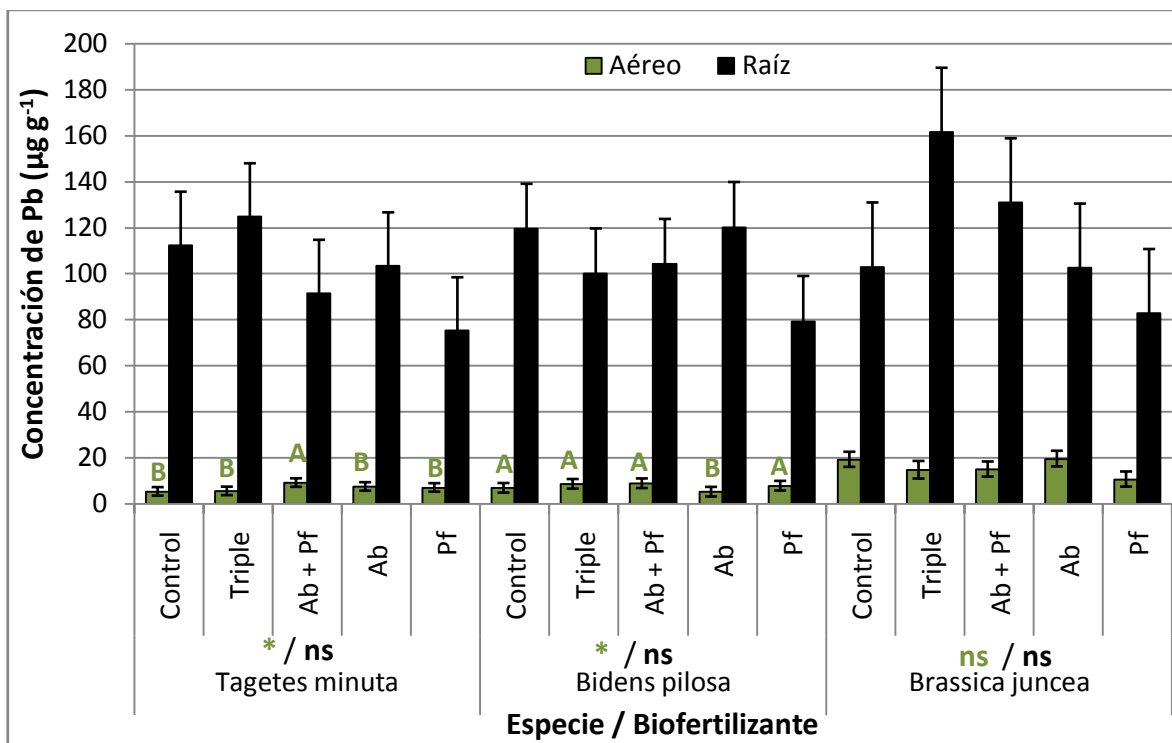
Figura 4.20. Producción de biomasa aérea y de raíz en *Tagetes minuta*, *Bidens pilosa* y *Brassica juncea* cuando crecen en suelos enriquecidos con Pb y son tratadas con aplicación de biofertilizantes.



Las comparaciones estadísticas fueron realizadas dentro de cada especie entre los tratamientos de biofertilizantes. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***). ns= no significativo. El color de las letras y de los niveles de significancia se corresponde con el órgano estudiado.

La aplicación de biofertilizantes no tuvo efecto alguno sobre la concentración de Pb en las raíces de ninguna de las tres especies estudiadas. En cuanto a la concentración de este metal en órganos aéreos puede decirse que únicamente se encontró un incremento en *T. minuta* cuando se le aplicó el tratamiento Ab + Pf. Las concentraciones de Pb encontradas en los órganos aéreos de *B. juncea* fueron superiores a las encontradas en *T. minuta* y *B. pilosa*, llegando en algunos casos a duplicarlas.

Figura 4.21. Concentración de Pb en parte aérea y raíces de *Tagetes minuta*, *Bidens pilosa* y *Brassica juncea* cuando crecen en suelos enriquecidos en Pb y son tratadas con biofertilizantes.

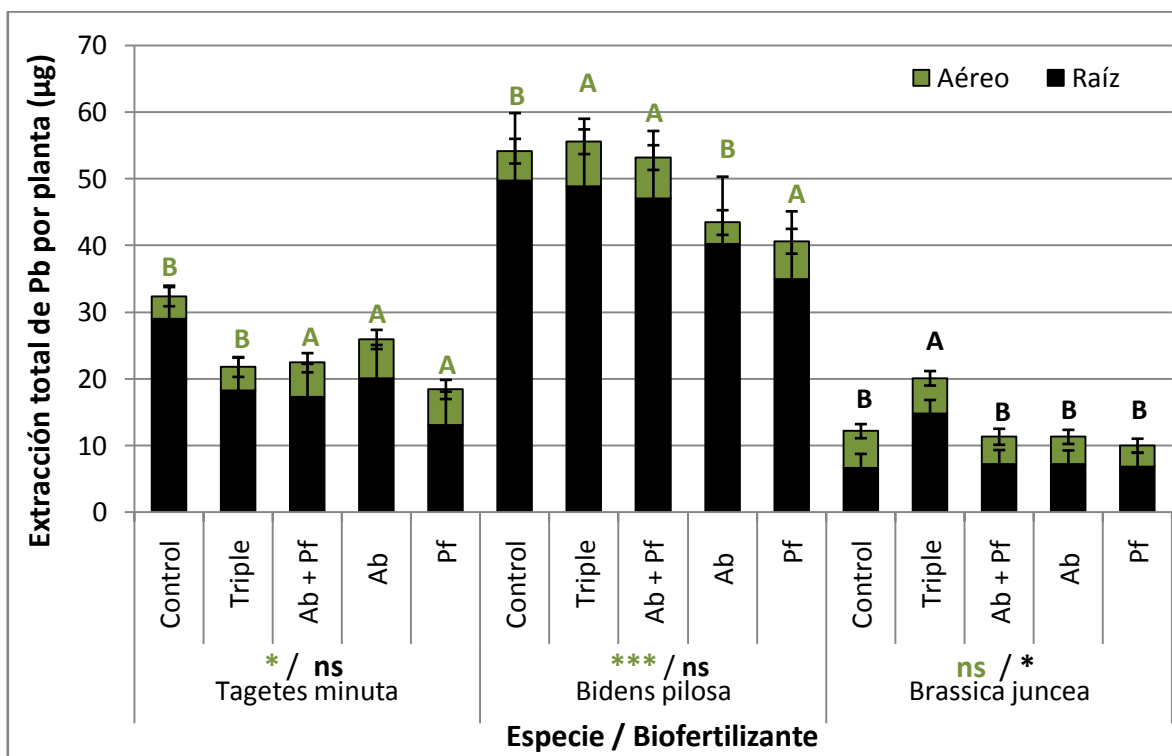


Las comparaciones estadísticas fueron realizadas dentro de cada especie entre los tratamientos de biofertilizantes. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***). ns= no significativo. El color de las letras y de los niveles de significancia se corresponde con el órgano estudiado.

La extracción radical de Pb por planta en *T. minuta* y *B. pilosa* no se vio influenciada por el uso de biofertilizantes, al contrario que la extracción por planta en órganos aéreos, incrementada por Ab + Pf (en un 75% con respecto al control) o estos por separado para la primera especie, y por Triple (en un 50% con respecto al control), Ab + Pf y Pf en la segunda. Al tener en cuenta las extracciones totales por planta sumando ambos órganos los biofertilizantes no fueron efectivos para estas especies, no obstante incrementar la extracción aérea por planta es importante desde el punto de vista de la fitoextracción del metal, ya que esta fracción de la planta es la fácilmente cosechable. En el caso de *B. juncea*, los microorganismos promotores del crecimiento vegetal lograron un incremento en la extracción de plomo por planta (dado principalmente en la raíz) cuando se aplicó el biofertilizante Triple. Este incremento fue de un 90% con respecto al control y a los otros biofertilizantes.

La extracción total por planta lograda por *B. pilosa* fue muy superior a la de las otras dos especies, más del doble que en *B. juncea* (especie de referencia) y el doble que *T. minuta*.

Figura 4.22. Extracción total de Pb por planta en parte aérea y raíces de *Tagetes minuta*, *Bidens pilosa* y *Brassica juncea* cuando crecen en suelos enriquecidos con plomo y son tratadas con biofertilizantes.



Las comparaciones estadísticas fueron realizadas dentro de cada especie entre los tratamientos de biofertilizantes. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***). ns= no significativo. El color de las letras y de los niveles de significancia se corresponde con el órgano estudiado.

4.5. Conclusiones

Los resultados expuestos en este capítulo permitieron demostrar que el efecto de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal sobre la acumulación de Pb en plantas es un fenómeno complejo y altamente específico, ya que las combinaciones de especies de microorganismos funcionan de modo muy disímil sobre distintas especies vegetales, interactuando además, con las condiciones del suelo. De todos modos se pudo establecer que el empleo de biofertilizantes durante los procesos de fitoextracción de Pb de

suelos enriquecidos con este metal mediado por *Tagetes minuta*, *Bidens pilosa* o *Brassica juncea* puede potenciar las tasas de extracción del metal si se utilizan *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens* para la primera, y una combinación de *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens* para las otras dos. La especie más eficiente como fitoextractora de plomo de suelos en este estudio resultó ser *Bidens pilosa*, superando ampliamente a la especie de referencia *Brassica juncea*.

Por otro lado, ninguna de las tres especies mostró preferencia por suelos limpios o contaminados, creciendo sus raíces de manera similar en todas las direcciones. No obstante, existe la posibilidad de que en determinadas condiciones algunos microorganismos, como por ejemplo *Azospirillum brasilense*, induzcan al desarrollo de la raíz con tropismo positivo hacia el Pb, tal como fue observado en las especies *B. juncea* y *B. pilosa*.

5. Capítulo V.

Influencia de microorganismos rizosféricos adaptados a suelos contaminados sobre la acumulación de Pb por *B. pilosa* y *T. minuta*.

Resumen

Los microorganismos del suelo presentes en la rizosfera de las plantas interactúan con esta de diversas maneras, pudiendo influenciar las tasas de acumulación y translocación de metales pesados, ya sea aumentándolas como reduciéndolas.

En el Capítulo II se observó que las plantas que crecían en suelos con elevadas concentraciones de plomo (Sitios 5 y 2) podían acumular y translocar más este metal (sitio 5) o menos (sitio 2), y que esto no se relacionaba con la concentración de Pb en el suelo. De esta manera, se planteó como posible explicación, la presencia de una diversidad microbiológica diferente en estos dos sitios. Esta hipótesis está respaldada parcialmente por los resultados encontrados en los experimentos presentados en el Capítulo IV de esta tesis, en los cuales se emplearon microorganismos comerciales. Los resultados mostraron que el efecto de la microbiota del suelo es fuertemente específico, observándose que los mismos microorganismos pueden causar efectos diferentes en las distintas especies vegetales. En base a esos resultados el objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de los microorganismos presentes naturalmente en los sitios seleccionados en el estudio a campo, mediante un experimento de cruce de microorganismos.

El experimento diseñado para estudiar el efecto de los microorganismos presentes en los suelos de Bouwer sobre la extracción de Pb por parte de las especies estudiadas presentó deficiencias técnicas debido a que el tratamiento por autoclave para controlar la microbiota del suelo interfirió con los resultados. De esta manera se encontró que el tratamiento térmico del suelo introduce modificaciones físico-químicas en el mismo que modifican la extracción de Pb por parte de las especies vegetales. Si bien este resultado no es aplicable a un posible proyecto de fitoextracción in situ, puede ser de interés para el tratamiento de lodos residuales provenientes de diferentes industrias.

Por otro lado, los resultados muestran que los microorganismos del suelo pueden modificar las tasas de extracción de Pb por parte de especies vegetales sin actuar directamente sobre las rutas de ingreso del contaminante a la planta. Es posible que el modo de acción de los microorganismos más bien esté relacionado con las rutas metabólicas de

los metales que son esenciales tanto para ellos como para las plantas, y que esto desencadene una alteración en la ruta de ingreso del Pb a las plantas.

5.1. Introducción

Los microorganismos del suelo presentes en la rizosfera de las plantas interactúan con esta de diversas maneras, pudiendo modificar las tasas de acumulación y translocación de metales pesados, ya sea aumentándolas como reduciéndolas (Ahmed et al., 2012; Gao et al., 2011; Gao et al., 2010; McGrath et al., 2001; White et al., 1995). Debido a que el sector de la raíz por el cual ingresan los metales y principalmente el Pb a las plantas se ve afectado por la inhibición de su crecimiento, los microorganismos promotores del crecimiento vegetal comerciales podrían representar una manera económica y accesible para mejorar la eficiencia extratora de plantas en metodologías de fitorremediación de suelos contaminados con plomo. Sin embargo, los resultados encontrados para la aplicación de biofertilizantes comerciales en *T. minuta*, *B. pilosa* y *B. juncea* no fueron del todo satisfactorios (Capítulo IV). Una explicación para estos resultados es que posiblemente los microorganismos que componen los biofertilizantes comerciales utilizados no están preparados para enfrentarse a las adversas condiciones de suelos con elevadas concentraciones de Pb. Así, los resultados hallados en el Capítulo IV nos llevaron a revisar los obtenidos en el Capítulo II y a plantear una nueva experiencia en relación a la presencia de microorganismos autóctonos en el suelo del área de estudio (Bouwer). En los resultados del Capítulo II se observó que las plantas que crecían en suelos muy contaminados con Pb (Sitios 5 y 2) podían acumular y translocar más Pb (sitio 5) o menos Pb (sitio 2) que los sitios control, por lo que esto no se relacionaba con la concentración del metal en el suelo. Se planteó como posible explicación la presencia de una diversidad microbiológica diferente en estos dos sitios, con lo cual, el objetivo de este capítulo fue evaluar esta hipótesis mediante un experimento de cruce de microorganismos. La predicción derivada de la hipótesis que guió el diseño experimental fue que las plantas que crezcan en presencia de los microorganismos del sitio 5 acumularan una mayor concentración de Pb y que las que crezcan en presencia de los microorganismos del sitio 2 acumularan una menor concentración de Pb.

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1. Obtención de los suelos

Los suelos utilizados en esta experiencia fueron obtenidos de las inmediaciones de la fundición que estaba localizada en Bouwer y del propio predio de la misma. Los sitios correspondieron a los denominados como “5” y “2” en el Capítulo II, sus propiedades pueden observarse en la Tabla 2.1., y la acumulación de Pb en las plantas que crecen en ellos se presentó en la Tabla 2.3.

Para su recolección se removieron manualmente la cobertura vegetal y los objetos extraños de la superficie. Utilizando pala de acero inoxidable se recolectó suelo superficial (15 cm de profundidad), y se lo almacenó en bolsas plásticas. Luego se procedió al secado a temperatura ambiente, al posterior tamizado a 2 mm y homogeneización mediante mezcla manual del mismo. El suelo recolectado de cada sitio fue fraccionado en 3 partes iguales para representar los siguientes tratamientos:

- Suelo del sitio 2, en adelante denominado “2”.
- Suelo del sitio 2 esterilizado y re-inoculado con sus propios microorganismos, en adelante denominado “2+2”.
- Suelo del sitio 2 esterilizado y re-inoculado con los microorganismos del sitio 5, en adelante denominado “2+5”.
- Suelo del sitio 5, en adelante denominado “5”.
- Suelo del sitio 5 esterilizado y re-inoculado con sus propios microorganismos, en adelante denominado “5+5”.
- Suelo del sitio 5 esterilizado y re-inoculado con los microorganismos del sitio 2, en adelante denominado “5+2”.

La esterilización se llevó a cabo utilizando una autoclave. Para las inoculaciones se realizó una extracción de los microorganismos de los suelos a partir de una fracción separada antes de la esterilización y conservada a 4°C. Para ello se preparó una suspensión de cada suelo en agua destilada (250 g de suelo en 1 L de agua). Luego de mezclar suavemente por 20 minutos se dejó decantar el sólido por gravedad y se filtró 62 µm

separándose el sobrenadante (Koide y Li, 1989; Pérez y Urcelay, 2009). Este se utilizó inmediatamente luego de su preparación.

5.2.2. Material vegetal

Semillas de *B. pilosa* y *T. minuta* fueron recolectadas en el predio de la ex-fundición de Pb en la localidad de Bouwer. Las mismas se sometieron a un proceso de imbibición en agua corriente durante 24 horas. Las semillas ya imbibidas fueron esterilizadas con NaClO 1% V/V mediante agitación manual durante 10 min, luego se lavaron con agua destilada y fueron puestas a germinar en cápsulas de Petri sobre papel de filtro humedecido con agua destilada (4 días en oscuridad).

5.2.3. Diseño experimental

Una vez que las plántulas tuvieron al menos un par de hojas verdaderas, se trasladaron a macetas de 1,5 L con suelos correspondientes a cada uno de los tratamientos. La base de las plántulas fue regada con 50 mL del extracto de microorganismos correspondientes a cada tratamiento. Cada tratamiento contó con 3 replicas.

Los tratamientos que consistieron en la re-inoculación de los microorganismos propios de cada suelo tuvieron la finalidad de evaluar los posibles efectos del proceso de esterilización sobre la disponibilidad del plomo en esos suelos.

La duración del experimento fue de 65 días como se estableció a partir de los resultados de los experimentos desarrollados en el Capítulo III. Una vez cumplido ese plazo, las plantas fueron retiradas y se separaron las muestras de los tres órganos: raíz, tallo y hojas. La raíz fue lavada con agua milli-Q y sonicada. Los tallos y las hojas también fueron lavados con agua milli-Q. Todas las muestras fueron llevadas a estufa a 60 °C hasta obtener peso seco constante y se determinó la biomasa seca total producida por planta y por órgano. Luego, las muestras fueron trituradas con molinillo de acero inoxidable y se conservaron en bolsas plásticas herméticas para su posterior análisis.

5.2.4. Determinación de la concentración de metales pesados en órganos vegetales

La concentración de Pb, Zn y Cu en los órganos de las plantas se determinó de acuerdo a Wannaz et al. (2011). Para esto se tomó 1 g PS de las muestras trituradas correspondientes a raíces, tallos y hojas de *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* para cada tratamiento para su análisis por Fluorescencia de Rayos X – Reflexión Total (TXRF) empleando radiación sincrotrón (LNLS, Brasil). El material vegetal fue reducido a cenizas en mufla a 450 °C por 4 h, las cenizas fueron digeridas con 3 mL de HNO₃ calidad analítica a 25 ± 2 °C. El residuo sólido se separó por centrifugación, y se ajustó el volumen del sobrenadante a 5 mL con agua Milli-Q y se añadieron 10 ppm de una solución de Ga como patrón interno. Se tomaron alícuotas de 5 µL de esta solución y se secaron sobre un soporte de acrílico. Se prepararon soluciones estándar con concentraciones conocidas de Cu⁺², Pb⁺² y Zn⁺² (también con Ga como patrón interno) para la calibración del sistema. Las mediciones se realizaron durante 200 s, utilizando la configuración de reflexión total montada en la línea de luz de fluorescencia de rayos X del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS), Campinas, SP, Brasil. Para ello, un haz policromático de aproximadamente 5 mm de ancho y 0,1 mm de altura se utilizó para la excitación. Para la detección de rayos X, se utilizó un detector de Si (Li) con una resolución de energía de 165 eV a 5,9 keV.

5.2.5. Control de calidad

Como control de calidad se utilizaron blancos y materiales certificados, los que fueron preparados de la misma manera que las muestras. El material certificado utilizado fue "CTA-OTL-1" (hojas de tabaco oriental, Instituto de Química y Tecnología Nuclear. OIEA)). Los porcentajes de recuperación para el material certificado vegetal fueron de 86 ± 7% para Pb, 81 ± 3 % para Cu, 84 ± 3 % para Co, 86 ± 5 % para Ni, 86 ± 8 % para Fe, 85 ± 2 % para Zn, y 84 ± 3 % para Mn, estos son porcentajes promedio y sus desvíos estándar expresados con respecto al valor declarado y teniendo en cuenta todas las determinaciones realizadas por TXRF en dicho material a lo largo de la tesis completa. Se encontró que los coeficientes de variación de los análisis entre replicados fueron inferiores al 10%.

5.2.6. Análisis de datos

5.2.6.1. Análisis estadísticos

Se utilizó el test de Shapiro-Wilks para evaluar la distribución normal de los datos, no observándose distribución no normal. Sin embargo los datos, nuevamente, presentaron heteroscedasticidad. Esto se debe a que la respuesta de los distintos individuos de cada especie vegetal presenta mayor variabilidad a medida que están expuestos a concentraciones más elevadas de Pb en suelo. No obstante este problema fue resuelto mediante la incorporación heteroscedasticidad en el modelo usando Infostat /E acoplado a R para realizar un análisis de varianza (ANOVA). Por tratarse de un diseño experimental a dos factores se evaluó primero la interacción entre los mismos. Cada vez que el ANOVA indicó efectos significativos ($p < 0,05$), se llevó a cabo una comparación por pares de medias mediante Tukey.

5.2.6.2. Factor de bioacumulación, factor de translocación y fitoextracción de plomo

Se calculó el factor bioacumulación (FBC) utilizando la relación entre la concentración Pb_{HCl} en los suelos (Tabla 2.1., Capítulo II) y la concentración del metal en la parte aérea de las plantas [$FBC = C_{a\acute{e}rea} / C_{suelo}$] (Bu-Olayan y Thomas, 2009).

Se calculó el factor de translocación desde la raíz a la parte aérea (FT R-A), utilizando la relación de la concentración de Pb en raíces y parte aérea [$FT\ R-A = C_{a\acute{e}rea} / C_{ra\acute{z}}$] (Bu-Olayan y Thomas, 2009). Para obtener el valor de extracción de plomo por órgano y por planta se multiplicó la concentración de Pb encontrada en cada órgano por la la biomasa seca producida por planta en ese órgano. Para obtener el valor de concentración de Pb en la parte aérea, la concentración cuantificada para las hojas y tallos se multiplicó por la biomasa total de cada órgano. Las diferentes masas de plomo se sumaron entre sí y esta suma se dividió por la biomasa total de los órganos aéreos:

$$C_{a\acute{e}rea} = (BioM_{hoja} \times C_{hoja} + BioM_{tallo} \times C_{tallo}) / (BioM_{hoja} + BioM_{tallo})$$

Donde C es concentración de Pb en el órgano indicado en el subíndice que corresponda, y BioM es la biomasa seca producida en el órgano indicado en el subíndice que corresponda.

5.3. Resultados

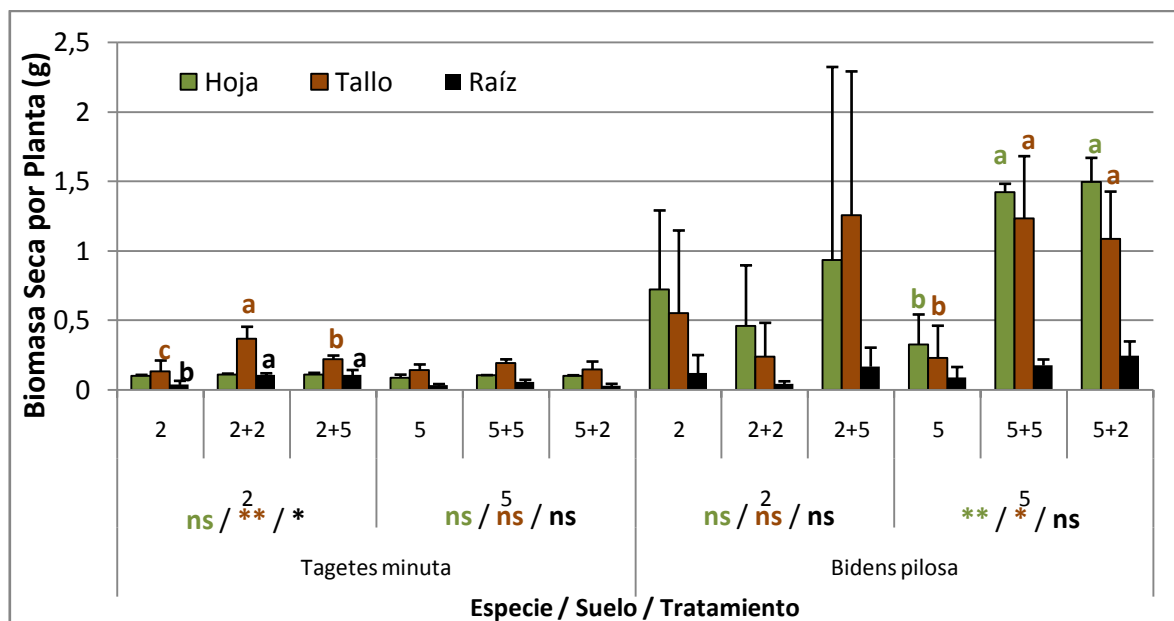
5.3.1. Producción de Biomasa

En la Figura 5.1. se presentan los resultados para el estudio de los efectos de los distintos tratamientos sobre la biomasa producida por órgano en *Bidens pilosa* y *Tagetes minuta*. Los análisis de la varianza (ANOVA) se realizaron por separado para cada especie y para los tratamientos con suelos provenientes de cada sitio. La esterilización y reinoculación con microorganismos propios o cruzando los de distintos sitios no produjeron diferencias significativas en la biomasa de *B. pilosa* cuando esta se cultivó en suelo del sitio 2, pero sí se observaron diferencias cuando fue cultivada en suelo del sitio 5. Así, se observó un incremento de la biomasa luego de la esterilización del suelo 5, independientemente del origen de los microorganismos inoculados para el cultivo. Esto podría estar relacionado con una aceleración en el proceso de descomposición de la materia orgánica por la temperatura mediante el cual se liberarían nutrientes. Sin embargo, la esterilización del suelo 2 no tuvo efecto alguno sobre el desarrollo de *B. pilosa*, aunque su re-inoculación con microorganismos del sitio 5 mostró una tendencia de incremento en la biomasa en esta especie. En el caso de *T. minuta*, se observó un fenómeno similar, aunque invertido. Los incrementos significativos en la biomasa se observaron cuando esta especie fue cultivada en suelos del sitio 2 (esterilizados y reinoculados) y no del sitio 5. Estos resultados indican, por un lado, que la esterilización de los suelos introduce alguna modificación en las propiedades de los mismos que puede estar liberando nutrientes o factores que estimulan el crecimiento de las plantas. Por otro lado, la alteración producida por la esterilización no tiene el mismo efecto en las dos especies estudiadas, ya que el incremento en la biomasa producida ocurrió en suelos distintos en cada una de ellas.

No se observaron cambios en la biomasa producida en relación al tipo de microorganismos existentes en el suelo, para ello se realizaron ANOVAs de los resultados

de cada especie comparando los tratamientos 2 vs 5; 2+2 vs 2+5; y 5+5 vs 5+2 (datos no presentados). Cabe destacar que la biomasa aérea de *B. pilosa* presentó una tendencia de aumento en su biomasa cuando creció en suelos del sitio 2 reinoculado con microorganismos del suelo 5.

Figura 5.1. Efecto de la esterilización y re-inoculación de suelos contaminados con Pb en la producción de biomasa de hojas, tallos y raíces por planta de *Bidens pilosa* y *Tagetes minuta*.



Niveles de significancia: ns, no significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ***. Letras diferentes indican diferencias significativas. Los colores de las letras indican el órgano vegetal al que corresponde el análisis.

5.3.2. Concentración de metales pesados en órganos vegetales de *T. minuta* y *B. pilosa*

En la Figura 5.2. se presentan los resultados de las concentraciones de Pb (A), Cu (B) y Zn (C) en hojas, tallos y raíces de *T. minuta* y *B. pilosa* cultivadas en suelos inoculados con microorganismos de suelos del área de estudio. Los análisis de la varianza (ANOVA) se realizaron por separado para cada especie y para los suelos provenientes de cada sitio, con la finalidad de evaluar el efecto de la esterilización de los mismos sobre la acumulación de los metales por las plantas. Para los tres elementos estudiados, la esterilización del suelo del sitio 5 causó una reducción de sus respectivas concentraciones en hojas de *B. pilosa*. Esto mismo ocurrió para la acumulación de Pb en el tallo de esta especie y para la concentración

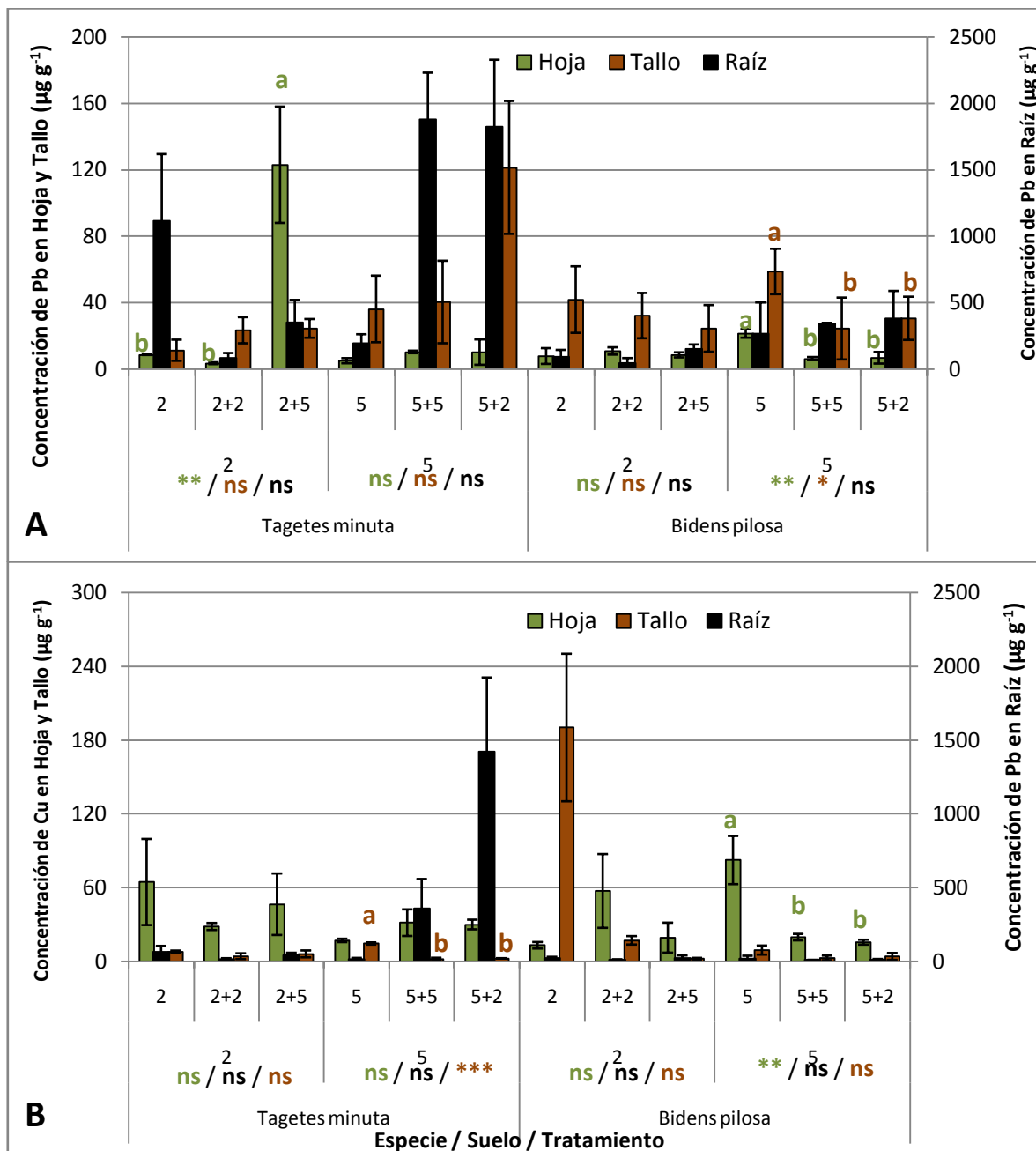
de Cu en tallos de *T. minuta*. Del mismo modo que para la biomasa producida por las plantas, se encontró que el efecto de la esterilización del suelo fue distinto para cada suelo y para cada especie. La esterilización del suelo del sitio 2 no provocó cambios en la acumulación de metales en ninguna de las dos especies, y para el caso de *T. minuta* se observó claramente que la presencia de microorganismos del sitio 5 puede incrementar la tasa extractiva de Pb y su acumulación en hojas. No obstante, el hecho de que la acumulación de Pb en hojas en plantas de esta especie que crecieron en los suelos del sitio 5 no haya sido superior a las del sitio 2, resta contundencia a aquel resultado.

La ausencia de efectos ante la esterilización del suelo sobre la acumulación de metales en la raíz permitió realizar algunas comparaciones entre los sitios y los cruces de microorganismos provenientes de ellos. *Bidens pilosa* mostró una acumulación de Pb en raíces significativamente ($p < 0,01$) más elevada cuando creció en suelos del sitio 5 que en suelos del sitio 2, sin verse esto afectado por el tipo de microorganismos presentes en los mismos [5; 5+5; 5+2 > 2; 2+2; 2+5]. Por su parte, *T. minuta* presentó diferencias significativas en la acumulación de Pb en raíces ($p < 0,05$) según los distintos tratamientos y combinaciones, con el siguiente orden: 5+5; 5+2; 2 > 2+2; 2+5; 5.

Es importante destacar que los valores máximos de Pb hallados en las raíces y hojas de *T. minuta* en este experimento, fueron ampliamente superiores a los encontrados en *B. pilosa* y aun a los encontrados en todas las etapas previas de esta tesis. Las concentraciones de Cu y Zn en raíces también fueron superiores en *T. minuta*, con valores extremos para Cu.

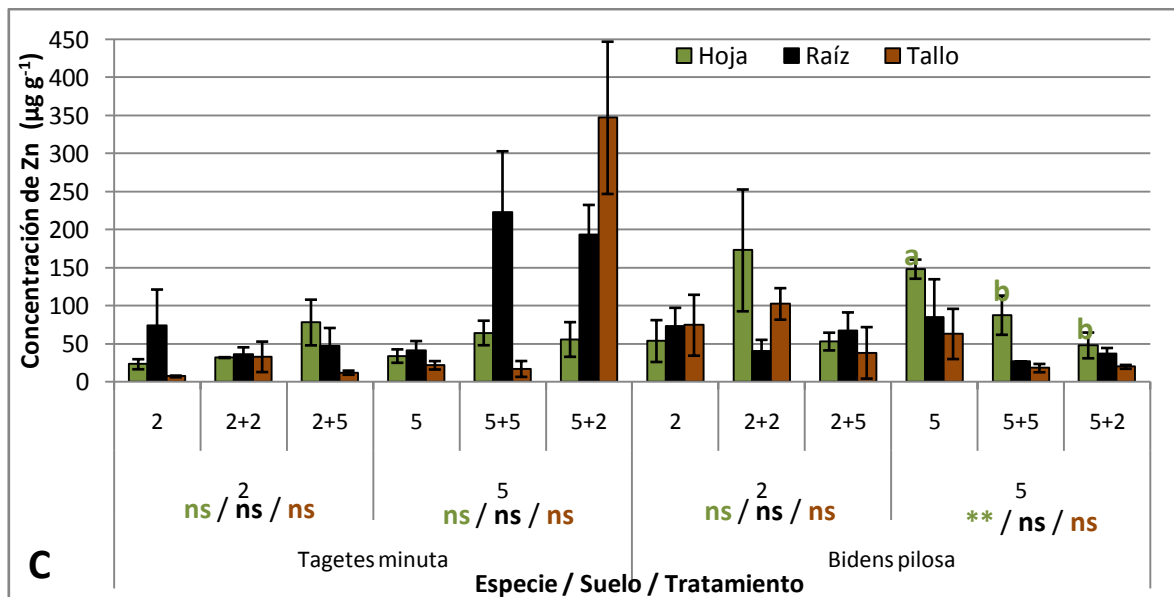
Con respecto a la concentración de Pb en los tallos no se observaron diferencias significativas entre las plantas de las dos especies cuando éstas crecieron en suelo del sitio 2 o del sitio 5, aunque se observó una tendencia similar a la descrita en los resultados del Capítulo II, con una acumulación ligeramente mayor en el sitio 5. El cruce de microorganismos no mostró efectos significativos sobre la acumulación de plomo en los tallos.

Figura 5.2. Efecto de la esterilización y re-inoculación del suelo sobre las concentraciones de Pb (A), Cu (B) y Zn (C) en hojas, tallos y raíces de *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa*.



Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***); ns = no significativo. Los colores de las letras indican el órgano vegetal al que corresponde el análisis.

Figura 5.2. (Continuación). Efecto de la esterilización y re-inoculación del suelo sobre la concentraciones de Pb (A), Cu (B) y Zn (C) en hojas, rallos y raíces de *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa*.



Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) ; ns = no significativo. Los colores de las letras indican el órgano vegetal al que corresponde el análisis.

5.3.3. Factores de Bioacumulación y Translocación

En la Tabla 5.1. se presentan los resultados para los factores de bioconcentración (FBC) y de translocación (FT) de Pb, Cu y Zn en *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa*.

Los FBC de Pb para *T. minuta* y *B. pilosa* fueron muy reducidos, no alcanzándose el valor de 1 (criterio para considerar a las especies acumuladoras). En el caso de *T. minuta* los FBC de Pb fueron de un orden de magnitud mayor cuando la especie creció en suelos del sitio 5, o en suelo del sitio 2 con microorganismos del sitio 5. *B. pilosa* también presentó un FBC de Pb mayor al crecer en suelos del sitio 5, aunque éste se vio fuertemente disminuido (50%) por el proceso de esterilización, y la inoculación de microorganismos del sitio 5 en los suelos del sitio 2 no produjo ningún cambio para esta especie. En cuanto a los FBC de Cu y de Zn, los tratamientos no introdujeron diferencias significativas para la especie *T. minuta*, pero sí lo hicieron para *B. pilosa*. Esta última mostró FBC de Cu y de Zn ampliamente superiores en el sitio 5 comparado al 2, los cuales fueron severamente disminuidos por el tratamiento de esterilización.

En general los FT de *B. pilosa* fueron superiores a los de *T. minuta*. Se observaron efectos significativos del proceso de esterilización del sustrato sobre el factor de translocación de Pb para ambas especies cuando se estudió el suelo proveniente del sitio 5, dichos efectos consistieron en una reducción drástica del mismo. No se encontraron diferencias significativas entre la translocación observada en el sitio 2 y la del sitio 5.

El factor de translocación de Cu para las plantas de ambas especies cultivadas en suelos del sitio 2 no se vio influenciado por el proceso de esterilización ya que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos 2 y 2+2. El tratamiento 2+5, sin embargo, provocó una disminución abrupta del FT de Cu, disminuyendo éste en un 50% para de *T. minuta* y en un 90% para *B. pilosa*. Al estudiar las plantas que crecieron en suelos del sitio 5 se observó nuevamente un fuerte efecto del proceso de esterilización del suelo sobre el FT de Cu para ambas especies, lo cual hace imposible analizar el efecto de los microorganismos. En cuanto al factor de translocación de Zn, no se encontraron efectos claros del proceso de esterilización del suelo ni del entrecruzamiento de microorganismos provenientes de suelos de ambos sitios.

La bibliografía muestra que el tratamiento térmico de los suelos puede introducir cambios en el pH y en la cantidad de carbono orgánico disuelto, esto interactúa con los distintos elementos y puede provocar un aumento en la solubilidad y biodisponibilidad (determinada mediante extracciones secuenciales) de Cu, Zn y Pb cuando se trata de temperaturas bajas (hasta 70 °C) o reducirla abruptamente cuando se superan temperaturas umbrales para cada metal. En el caso de Cu y Zn la biodisponibilidad es cada vez mayor hasta que se superan los 70 °C y los 90 °C respectivamente, mientras que Pb suele aumentar su biodisponibilidad cuando se trata al suelo con temperaturas superiores a los 400 °C (Martínez et al., 2003; Martínez y McBride, 1998; Wunsch et al., 1996). Los resultados encontrados en esta tesis para los FBC y FT indicarían que el tratamiento de autoclavado (120 °C) aplicado a los suelos provoca una reducción significativa en la biodisponibilidad de Cu y Zn, sin provocar grandes cambios en la de Pb, siendo esto demostrado *in vivo* y no mediante extracciones secuenciales.

Tabla 5.1. Efecto de la esterilización del suelo y el cruce de microorganismos sobre los factores de bioacumulación y de translocación de Pb, Cu y Zn de *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa*.

		Factor de Bioconcentración (FBC) ± DS			Factor de Translocación (FT) ± DS		
Suelo	Tratamiento	<i>Tagetes minuta</i>		<i>Bidens pilosa</i>	<i>Tagetes minuta</i>		<i>Bidens pilosa</i>
Pb	2	b 0,004 ± 0,003		0,007 ± 0,001	0,09±0,06		0,29±0,19
	2	* b 0,008 ± 0,005	ns	0,007 ± 0,001	ns 0,23±0,02	ns	0,61±0,21
	2	a 0,025 ± 0,008		0,006 ± 0,001	0,22±0,08		0,11±0,09
	5	0,02 ± 0,01		a 0,023 ± 0,003	a 0,13±0,04		a 0,19±0,03
	5	ns 0,02 ± 0,01	*	b 0,012 ± 0,001	* b 0,04±0,03	*	b 0,06±0,04
	5	0,06 ± 0,02		b 0,009 ± 0,001	b 0,02±0,01		b 0,04±0,02
Cu	2	4 ± 2		6,1 ± 5,1	a 0,68±0,26		a 4,4±2,9
	2	ns 1,0 ± 0,6	ns	3,9 ± 2,4	* a 0,84±0,28	*	a 4,5±2,6
	2	2,1 ± 0,6		0,74 ± 0,21	b 0,48±0,15		b 0,5±0,4
	5	3,8 ± 0,1		a 14 ± 2	a 1,09±0,23		a 7,3±1,6
	5	ns 3,5 ± 0,5	*	b 3,9 ± 2,4	* b 0,08±0,04	**	b 1,0±0,6
	5	3,1 ± 0,6		b 2,96 ± 0,09	b 0,23±0,08		b 1,4±0,5
Zn	2	0,8 ± 0,5		1,22 ± 0,2	0,27±0,18		b 0,83±0,44
	2	ns 1,1 ± 0,7	ns	3,02 ± 1,41	ns 1,01±0,35	*	a 3,09±0,54
	2	0,8 ± 0,4		0,9 ± 0,2	0,75±0,31		b 0,7±0,5
	5	3,4 ± 0,6		a 14 ± 2	0,67±0,16		3,43±0,91
	5	ns 32 ± 27	*	b 4,7 ± 0,8	ns 1,34±0,66	ns	1,0±0,4
	5	4,2 ± 0,6		b 7 ± 1	0,25±0,17		2,12±0,66

Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***); ns = no significativo. Comparaciones entre tratamientos dentro de un mismo suelo y una misma especie.

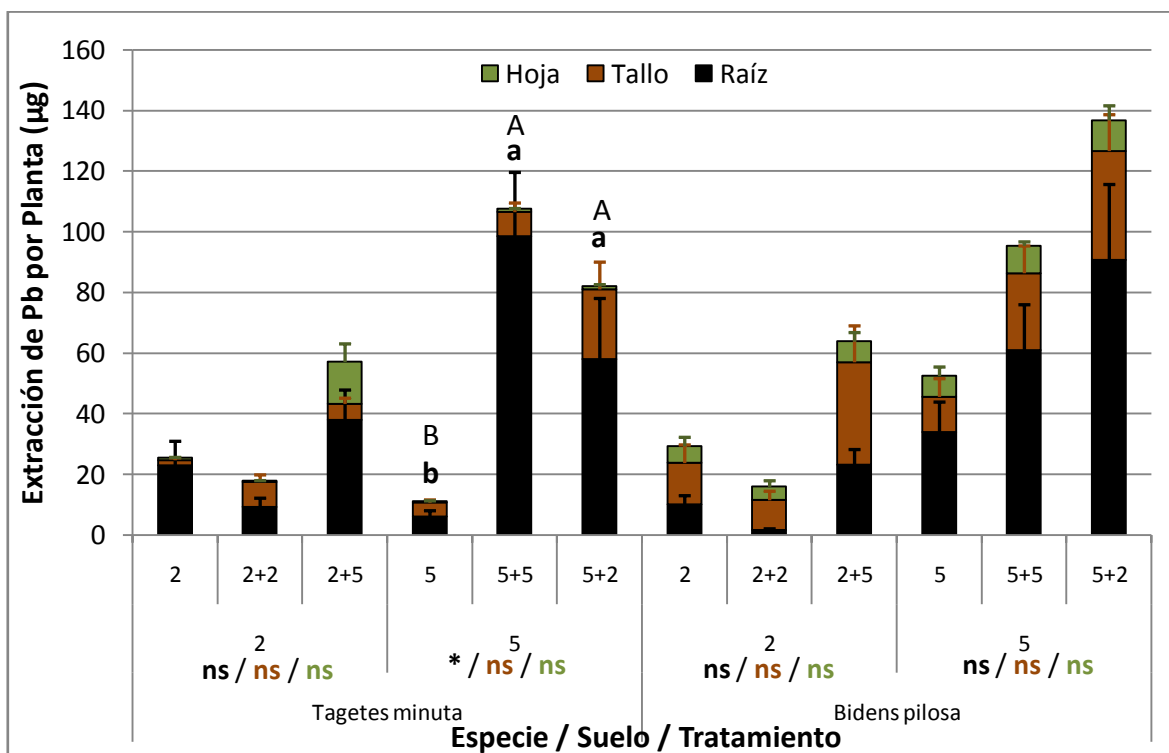
5.3.4. Extracción total por planta y órgano

En la Figura 5.3. se muestran los valores de extracción de Pb por planta y su distribución entre los distintos órganos (raíz, tallo y hojas) para *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa*. La esterilización de los suelos provenientes de los sitios 2 y 5 no produjo efectos significativos en la extracción total o por órganos de Pb en *Bidens pilosa*. Tampoco se observaron efectos por el intercambio de microorganismos, aunque puede observarse una tendencia más clara y con valores probabilísticos más cercanos a la significancia en la comparación de los tratamientos 2+2 y 2+5 que entre los tratamientos 5+5 y 5+2. En esta especie la introducción de microorganismos del sitio 5 en suelos del sitio 2 generó una tendencia de aumento en la extracción de Pb en las raíces, los tallos y la planta en su conjunto.

En el caso de *T. minuta*, la esterilización del suelo del sitio 5 produjo un incremento muy marcado en la extracción por planta en la raíz. Este incremento fue tan elevado que se tradujo con el mismo efecto para la extracción total por planta. Para esta especie, en los suelos del sitio 2 la esterilización no modificó la extracción por planta, Si bien el cruce de microorganismos no introdujo diferencias significativas en la extracción de Pb por parte de *T. minuta*, se observó una tendencia, con $p=0,06$, de aumento en la extracción foliar, radical y total por planta cuando se introdujeron microorganismos del sitio 5 en los suelos del sitio 2.

En términos generales puede decirse que para ambas especies resultó más favorable la extracción de Pb en el suelo 5, y que *Bidens pilosa* mostró tasas de extracción más elevadas que *Tagetes minuta*, y lo que es más importante, localizó mayor cantidad del metal en tejidos aéreos.

Figura 5.3. Efecto de la esterilización del suelo y el cruce de microorganismos sobre la extracción total de Pb por planta y órgano de *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa*.



Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) ; ns = no significativo. Los colores de las letras minúsculas indican el órgano vegetal al que corresponde el análisis. Las letras mayúsculas corresponden al análisis de la extracción total por planta sumando los tres órganos.

5.4. Discusión

El efecto de la esterilización del suelo sobre todas las variables estudiadas fue mayor del esperado, dificultando la evaluación de la influencia de los microorganismos edáficos presentes en el sitio de estudio. Esto podría deberse a que uno de los factores más importante en relación a la disponibilidad de metales pesados es la materia orgánica del suelo en relación a los compuestos que ésta puede formar con los metales (Bermudez et al., 2010; Kashem y Singh, 2001). El proceso térmico empleado para la esterilización del suelo pudo haber atacado no solo su microdiversidad, sino también la composición química de la materia orgánica presente, favoreciendo la formación de complejos poco solubles con los metales, o la disociación de otros compuestos preexistentes en el suelo (Martínez et al., 2003; Martínez y McBride, 1998; Wunsch et al., 1996; Gallardo et al., 1987). Si bien en la aplicación de metodologías de fitorremediación (en este caso se trataría de

fitoestabilización) de suelos no es factible proceder al tratamiento térmico de la totalidad del suelo afectado, los resultados muestran que la descomposición de la materia orgánica, es un factor a tener en cuenta cuando se aplica esta tecnología (Cunningham et al., 1995).

Pese al efecto no deseado del procedimiento de esterilización estudiado en estas experiencias, se pueden observar tendencias importantes. Desde el punto de vista de la fitoextracción de Pb, los microorganismos presentes en suelo del sitio 5 parecen haber favorecido más a *Bidens pilosa* que a *Tagetes minuta* en términos de promover un mayor desarrollo de biomasa, fundamentalmente de la aérea (hoja y tallo). Los datos obtenidos para la concentración de Pb, Cu y Zn y sus factores de translocación muestran que los efectos de la esterilización y del tratamiento no fueron iguales en ambos suelos, ni en ambas especies, ni para los tres metales. El hecho de que el ingreso y la translocación de otros metales se haya visto modificada por los tratamientos puede estar revelando sinergias difíciles de detectar cuando las variables de respuesta se analizan por separado. El tipo de microorganismos presentes en el suelo puede afectar la incorporación de Cu y Zn y este cambio puede ser responsable de los patrones de extracción de Pb observados. Esto, sumado a la gran variabilidad de respuesta entre los individuos cuando las concentraciones de Pb en suelo son altas, dificultan la interpretación de los resultados. Con la finalidad de integrar todos los resultados se realizaron correlaciones de Spearman entre las concentraciones de los tres elementos en los tres órganos y regresiones lineales múltiples incluyendo FT y tasas de extracción con el objetivo de identificar posibles vínculos entre las variables de respuesta. En la Tabla 5.2. se muestran los resultados de las correlaciones y en la Tabla 5.3., los de las regresiones múltiples que explican las variables que se asociaron con las concentraciones de Pb en las distintas partes de la planta como así también con las tasas de extracción total por planta.

Se observó una fuerte correlación positiva entre las concentraciones de Pb, Cu y Zn en hojas, entre Pb y Zn en tallo, y entre Pb, Cu y Zn en raíz para *T. minuta*; y entre Pb, Cu y Zn en hojas y entre Pb, Cu y Zn en tallo para *B. pilosa*. Profundizando estas interacciones, los resultados del análisis de regresión muestran un alto grado de asociación entre Pb, Zn y Cu. Para *Bidens pilosa* el contenido de Cu en la planta se asoció con una disminución de Pb en la misma, y el contenido de Zn con un aumento en la acumulación de Pb. En *T. minuta* las relaciones no fueron tan claras ya que el la extracción de Pb y su acumulación en hojas

se vieron favorecidos tanto por el ingreso de Cu como de Zn en la planta; mientras que el contenido y la extracción de Pb en tallo se vio asociado con un aumento en la acumulación de Zn y en sentido inverso disminuyó al aumentar la acumulación de Cu.

Tabla 5.2. Coeficientes de correlación de Spearman y sus valores de probabilidad entre las concentraciones de Pb, Cu y Zn encontradas en hojas, tallos y raíces de *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa*.

<i>Tagetes minuta</i>									
	Pb Hoja	Cu Hoja	Zn Hoja	Pb Tallo	Cu Tallo	Zn Tallo	Pb Raíz	Cu Raíz	Zn Raíz
Pb Hoja	1	0,06	0,06	0,52	0,42	0,15	0,08	0,06	0,14
Cu Hoja	0,45	1	0,58	0,36	0,06	0,18	0,07	0,04	0,27
Zn Hoja	0,46	0,13	1	0,04	0,04	0,24	0,07	0,15	0,03
Pb Tallo	-0,16	-0,22	0,5	1	0,46	0,01	0,26	0,4	0,11
Cu Tallo	-0,2	-0,45	-0,5	-0,18	1	0,57	0,14	0,12	0,26
Zn Tallo	-0,35	-0,33	0,29	0,81	-0,14	1	0,53	0,66	0,65
Pb Raíz	0,43	0,43	0,43	0,28	-0,35	0,15	1	0,004	0,005
Cu Raíz	0,46	0,49	0,35	0,21	-0,38	-0,11	0,7	1	0,002
Zn Raíz	0,35	0,27	0,51	0,38	-0,28	0,11	0,69	0,76	1

<i>Bidens pilosa</i>									
	Pb Hoja	Cu Hoja	Zn Hoja	Pb Tallo	Cu Tallo	Zn Tallo	Pb Raíz	Cu Raíz	Zn Raíz
Pb Hoja	1	0,04	0,01	0,68	0,23	0,52	0,24	0,61	0,81
Cu Hoja	0,5	1	0,001	0,64	0,94	0,92	0,5	0,54	0,9
Zn Hoja	0,65	0,79	1	0,8	0,8	0,69	0,81	0,29	0,47
Pb Tallo	0,1	0,11	-0,06	1	0,03	0,01	0,52	0,23	0,69
Cu Tallo	0,29	0,02	-0,06	0,52	1	0,001	0,01	0,53	0,76
Zn Tallo	0,16	-0,02	-0,1	0,66	0,8	1	0,01	0,32	0,53
Pb Raíz	-0,29	0,16	0,06	-0,16	-0,6	-0,63	1	0,48	0,84
Cu Raíz	-0,12	-0,15	-0,25	-0,29	-0,15	-0,24	0,17	1	0,003
Zn Raíz	0,06	-0,03	-0,17	-0,1	-0,08	-0,15	0,05	0,72	1

Los valores sobre la diagonal indican los valores de p para cada cruce, indicándose en verde los significativos. Los valores bajo la diagonal indican los coeficientes de correlación de Spearman, indicándose en verde los que presentaron un valor de p significativo y en naranja los que tuvieron un valor muy próximo a la significancia estadística.

Los microorganismos de suelo del sitio 5, inoculados en suelo del sitio 2, causaron una reducción en la translocación de Cu y Zn de ambas especies pero no alteraron el factor de translocación de Pb (Tabla 5.1.). Estos resultados sugieren que los microorganismos del suelo influenciaron las tasas de extracción de Pb por parte de las especies estudiadas sin actuar directamente sobre las rutas de ingreso del contaminante a la planta. Es posible que

los microorganismos del suelo modifiquen la solubilidad y movilidad, así como la especie química en la que se encuentran los metales esenciales, tanto para ellos como para las plantas, o aún promuevan su incorporación en estas últimas y que esto promueva el ingreso del Pb a las plantas a través de alguna de las vías por las que ingresan Zn o Cu.

Tabla 5.3. Regresiones lineales múltiples que vinculan las variables Cu y Zn con Pb en la acumulación de Pb por *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa*.

	Modelo	R ²	P
<i>Bidens pilosa</i>			
Pb Hoja	8,39*** + 0,25***.Cu Hoja - 0,07**.Zn Hoja - 0,01*.Cu Tallo	0,73	**
Pb Tallo	34,16*** + 3,73**.FT Cu - 0,26**.Zn Hoja + 0,42*.Cu Hoja	0,68	*
<i>Tagetes minuta</i>			
Pb Hoja	-67,2** + 1,83***.Zn Hoja + 0,61*.Cu Hoja	0,73	**
Pb Tallo	16,85** + 0,24***.Zn Tallo + 0,08*.Zn Raíz	0,96	***
Ext Pb Hoja	- 7,37** + 0,2***.Zn Hoja + 0,07*.Cu Hoja	0,71	***
Ext Pb Tallo	7,58*** + 0,05***.Zn Tallo -0,04*. Cu Hoja - 0,26. Cu Tallo	0,97	***

Niveles de significancia estadística * = p<0,05; ** = p <0,01; *** = p <0,001. El símbolo del elemento seguido de un subíndice corresponde a las variables de concentración de ese elemento en el órgano del subíndice. FT = factor de translocación. Ext = Extracción por planta.

5.5. Conclusiones

Los resultados del experimento diseñado para estudiar el efecto de los microorganismos de los suelos de Bouwer sobre la extracción de Pb por parte de las especies estudiadas presentó interacción con uno de los pasos metodológicos (esterilización térmica del suelo). El tratamiento térmico del suelo introdujo modificaciones en el mismo de manera que modificó la extracción de Pb del suelo por parte de ambas especies.

La composición de microorganismos del suelo influyó las tasas de extracción de Pb en *T. minuta* y *B. pilosa* si bien no modificó las rutas de ingreso del contaminante a la planta (acumulación concentrada en raíces). Es posible que los efectos de los microorganismos estén relacionados con cambios en la especiación de los metales que son elementos esenciales tanto para ellos como para las plantas, y que esto desencadene las modificaciones observadas en el ingreso del Pb a las plantas.

6. Capítulo VI.

Acumulación de Pb en *Bidens pilosa* y *Tagetes minuta* cuando crecen en suelos contaminados frente al agregado de Cu y Zn.

Resumen

Existen numerosos antecedentes sobre fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados como Cu, Zn, Cd, Ni, entre otros. En general es posible desarrollar proyectos de fitoextracción de dichos metales sin inducir forzosamente un aumento de la eficiencia de las plantas acumuladoras. En el caso particular de suelos contaminados con Pb, la bibliografía indica una imposibilidad generalizada en la translocación de este contaminante hacia la parte aérea de la mayoría de las plantas, debido fundamentalmente a su toxicidad, lo cual dificulta la implementación de metodologías para la fitoextracción de Pb de suelos contaminados. Es por eso que, cuando se trata de Pb, es necesario combinar factores tanto del suelo como de la fisiología de las plantas que aumenten significativamente la translocación del metal a los tejidos aéreos en las especies seleccionadas.

Con el objetivo de ampliar el conocimiento sobre las condiciones del suelo y de las especies vegetales que participan en la absorción y translocación de Pb en *T. minuta* y *B. pilosa*, en experimentos anteriores (Capítulos IV y V) se evaluó principalmente la influencia de los microorganismos del suelo. Paralelamente, se observaron posibles relaciones entre la absorción y translocación de Pb y otros metales: Zn y Cu (Capítulos II y V). En relación a esto puede destacarse que existe abundante conocimiento sobre los mecanismos utilizados para la absorción de otros metales pesados presentes en suelos contaminados, tales como Cd, Zn, Cu, Ni; pero los mecanismos por los cuales las plantas incorporan Pb todavía no están bien estudiados ni comprendidos. Algunos autores informaron sobre fenómenos de competencia entre Pb y Ca, dando una posible explicación a las rutas de ingreso del Pb en plantas, pero es necesario que se evalúen otras vías posibles, ya que este mecanismo parece no ser específico. Si la relación entre Zn, Cu (elementos esenciales) y Pb fuera determinante para la extracción del contaminante, esto podría ser la clave para la implementación de metodologías para la fitoextracción de Pb de suelos contaminados. Es por ello que en este capítulo el objetivo de investigación fue estudiar experimentalmente la influencia del agregado de Zn y Cu a suelos contaminados con Pb a fin de estudiar el efecto de estos metales sobre la extracción de Pb por parte de *B. pilosa* y *T. minuta*.

Si bien no se logró incrementar la tasa de extracción neta de Pb por parte de las especies estudiadas al agregar Zn y Cu, se reafirmaron las asociaciones observadas previamente entre estos elementos, lo que confirmaría una interdependencia de los mismos en los mecanismos de captación y translocación de estos metales mediante los cuales las plantas los incorporan y movilizan.

6.1. Introducción

Existen numerosos antecedentes sobre fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados como Cu, Zn, Cd, Ni, entre otros (Ahmed et al., 2012; Baltazar y Surisadai, 2012). En general es posible desarrollar metodologías para la fitoextracción de dichos metales sin inducir forzosamente un aumento de la eficiencia en las plantas acumuladoras (Ghosh y Singh, 2005), pero en el caso particular de suelos contaminados con Pb, la bibliografía señala una imposibilidad generalizada en la translocación de este metal hacia la parte aérea de la mayoría de las especies estudiadas, lo cual dificulta la implementación de tecnologías basadas en la capacidad fitoextractora de plantas para remediar suelos contaminados con Pb (Baker, 1981; Pourrut et al., 2011). Es por eso que, cuando se trata de este metal se hace necesario combinar factores tanto del suelo como de la fisiología de las plantas que aumenten significativamente la translocación del metal a los tejidos aéreos en las especies seleccionadas.

Algunos estudios han reportado buenos resultados en la selección de especies mediante el uso de los sitios contaminados como banco de genes tolerantes a ciertos metales y el empleo de estas plantas en la fitorremediación de suelos, práctica que implica un impacto de intervención mínimo (Becerril Soto et al., 2007). Sin embargo, la implementación de esta tecnología presenta ciertas dificultades cuando se trata de contaminación por Pb debido a que la complejidad en su acumulación por ser uno de los metales más fitotóxicos, está lejos de ser comprendida y varios aspectos de su absorción, translocación y acumulación aún no tienen explicación (Rascio y Navari-Izzo, 2011). Esos conocimientos serían muy importantes para lograr incrementar la capacidad de las plantas para absorber y acumular el metal, ya sea aumentando la producción de biomasa o favoreciendo su acumulación en órganos aéreos de la plantas sin que sus niveles supongan toxicidad. Otros de los aspectos a

considerar son las interacciones del metal con la rizosfera, lo cual puede modificar su biodisponibilidad, así como los posibles fenómenos de competencia con otros iones metálicos, lo que favorecería su incorporación en especies ya detectadas como acumuladoras (Montes Botella, 2001).

En los Capítulos II y V se observaron asociaciones entre la captación de Pb y los metales Zn y Cu. En relación a esto existe abundante conocimiento sobre los mecanismos utilizados para la absorción por plantas de metales tales como Cd, Zn, Cu, Ni cuando crecen en suelos contaminados por éstos (Clemens et al., 2002). Sin embargo, la absorción y acumulación de Pb por plantas no ha sido bien estudiada y sus mecanismos no han sido descritos (Pourrut et al., 2011). Para algunas especies se demostró un fenómeno de competencia entre Pb y Ca fundamentalmente asociado a los sitios de ingreso y en los transportadores del metal dentro de las plantas (Pourrut et al., 2008; Wang et al., 2007), sin embargo, es necesario que se evalúen otras vías posibles de ingreso del contaminante a la planta ya que este fenómeno parece no ser específico (Pourrut et al., 2011). En este contexto y dados los resultados de capítulos anteriores, se planteó como hipótesis que la relación entre Zn, Cu y Pb es determinante para la extracción de Pb por parte de las plantas. Con lo cual se espera que al modificar las concentraciones de Cu y Zn en suelo, manteniendo el contenido de Pb, la acumulación y extracción del contaminante por parte de *T. minuta* y *B. pilosa* debería verse alterada. De cumplirse dicha hipótesis, este mecanismo podría ser la clave en el mejoramiento de la eficiencia de ciertas especies acumuladoras de plomo, con lo cual podrían proponerse para su empleo en tecnologías de fitoextracción de Pb de suelos. Es por ello que en este capítulo el objetivo de investigación fue estudiar experimentalmente la influencia del agregado de Zn y Cu solubles a suelos contaminados con Pb a fin de estudiar el efecto de estos metales sobre la extracción de Pb por parte de *B. pilosa* y *T. minuta*.

6.2. Materiales y Métodos

6.2.1. Suelos

Los suelos utilizados en esta experiencia fueron obtenidos de las inmediaciones de la exfundición de Bouwer. El sitio de extracción se describió en el Capítulo II como “5”. Sus propiedades pueden observarse en la Tabla 2.1., y la acumulación de Pb en las plantas que crecen en él se presentó en la Tabla 2.3.

Para su recolección se removieron manualmente la cobertura vegetal y los objetos extraños de la superficie. Utilizando pala de acero inoxidable se recolectó suelo superficial (15 cm de profundidad), y se lo almacenó en bolsas plásticas. El suelo recolectado fue fraccionado en 3 partes iguales para obtener los siguientes tratamientos:

- Suelo del sitio 5. En adelante “Control”
- Suelo del sitio 5 enriquecido en Zn (hasta alcanzar una concentración de 100 mg kg⁻¹ PS). En adelante “T-Zn”.
- Suelo del sitio 5 enriquecido en Cu (hasta alcanzar una concentración de 100 mg kg⁻¹ PS). En adelante “T-Cu”.

El enriquecimiento correspondiente a cada tratamiento se realizó dispersando la sal correspondiente a cada elemento (Zn(NO₃)₂ y CuSO₄) en seco durante el tamizado a 2 mm con posterior homogeneización en una mezcladora industrial. Con posterioridad se tomaron 3 muestras aleatorias de cada suelo a los que se añadieron Zn y Cu y se determinó en las mismas la concentración de los metales añadidos, constatándose el nivel alcanzado y la homogeneidad de la mezcla (89 ± 12 mg kg⁻¹ para el T-Zn y 106 ± 8 mg kg⁻¹ para el T-Cu).

6.2.2. Material vegetal

Semillas de *B. pilosa* y *T. minuta* fueron recolectadas en el predio de la ex-fundición de Pb en la localidad de Bouwer. Las mismas se sometieron a un proceso de imbibición en agua corriente durante 24 horas. Las semillas ya imbibidas se esterilizaron con NaClO 1% V/V mediante agitación manual durante 10 min, luego fueron lavadas con agua destilada y

se hicieron germinar en cápsulas de Petri sobre papel de filtro humedecidos con agua destilada (4 días en oscuridad).

6.2.3. Diseño experimental

Una vez que las plántulas tuvieron al menos un par de hojas verdaderas, se trasladaron a macetas de 1,5 L. Cada tratamiento tuvo tres réplicas. La duración del experimento fue de 65 días desde el transplante como se estableció en el Capítulo III. Una vez cumplido ese plazo, las plantas fueron retiradas y se separaron los tres órganos: raíz, tallo y hojas, los que fueron lavados con agua milli-Q y en el caso de las raíces estas fueron sonicadas. Las muestras fueron llevadas a estufa a 60 °C hasta obtener peso seco constante, determinándose la biomasa seca total producida por planta y por órgano. Luego las muestras fueron trituradas con molinillo de acero inoxidable y se conservaron en bolsas plásticas herméticas hasta su posterior análisis.

6.2.4. Determinación de la concentración de metales pesados en órganos vegetales

La concentraciones de Pb, Zn y Cu en los órganos de las plantas se determinaron de acuerdo a Wannaz et al. (2011). Para esto, se tomó 1 g PS de las muestras trituradas de raíces, tallos y hojas de *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* correspondientes a cada tratamiento para el análisis de los metales por Fluorescencia de Rayos X-Reflexión Total (TXRF) usando radiación de sincrotrón. El material vegetal fue reducido a cenizas en mufla a 450 °C por 4 h, a las que se agregaron luego 3 mL de HNO₃ calidad analítica a 25 ± 2 °C. El residuo sólido se separó por centrifugación, y se ajustó el volumen del sobrenadante a 5 mL con agua Milli-Q. Después, se añadieron 10 ppm de una solución de Ga como estándar interno. Se tomaron alícuotas de 5 µL de esta solución y se las secó sobre un soporte de acrílico. Se prepararon soluciones estándar con concentraciones conocidas de Cu⁺², Pb⁺² y Zn⁺² (también con Ga como patrón interno) para la calibración del sistema. Las muestras fueron medidas durante 200 s, utilizando la configuración de reflexión total montada en la línea de luz de fluorescencia de rayos X del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS), Campinas, SP, Brasil. Para ello, un haz policromático de aproximadamente 5 mm

de ancho y 0,1 mm de altura se utilizó para la excitación. Para la detección de rayos X, se utilizó un detector de Si (Li) con una resolución de energía de 165 eV a 5,9 keV.

6.2.5. Control de calidad

Como control de calidad se utilizaron blancos y materiales certificados. Los mismos fueron preparados de la misma manera que las muestras. El material certificado utilizado fue "CTA-OTL-1" (hojas de tabaco oriental, Instituto de Química y Tecnología Nuclear, OIEA). Los porcentajes de recuperación para el material certificado vegetal fueron de $86 \pm 7\%$ para Pb, $81 \pm 3\%$ para Cu, $84 \pm 3\%$ para Co, $86 \pm 5\%$ para Ni, $86 \pm 8\%$ para Fe, $85 \pm 2\%$ para Zn, y $84 \pm 3\%$ para Mn, estos son porcentajes promedio y sus desvíos estándar expresados con respecto al valor declarado y teniendo en cuenta todas las determinaciones realizadas por TXRF en dicho material a lo largo de la tesis completa. Se encontró que los coeficientes de variación de los análisis entre replicados fueron inferiores al 10%.

6.2.6. Análisis de datos

6.2.6.1. Análisis estadísticos

Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilks para evaluar la distribución normal de los resultados. No se encontraron datos con distribución no normal. Se utilizó Infostat /E acoplado a R para realizar un análisis de varianza (ANOVA). Cada vez que el ANOVA indicó efectos significativos ($p < 0,05$), se llevó a cabo una comparación por pares de medias mediante la prueba de Tukey. También se realizaron regresiones lineales simples y múltiples (modelo stepwise).

6.2.6.2. Factores de translocación y fitoextracción de plomo

Se calculó el factor de translocación desde raíz a parte aérea (FT R-A), utilizando la relación de la concentración de Pb en raíces y parte aérea [$FT\ R-A = C_{a\acute{e}rea} / C_{ra\acute{i}z}$] (Bulayan y Thomas, 2009). Para obtener el valor de extracción total de plomo por órgano y por planta se multiplicó la concentración de Pb encontrada en cada órgano por la biomasa seca producida por planta en ese órgano. Para obtener la concentración de Pb en la parte aérea, la concentración cuantificada para las hojas y tallos se multiplicó por la biomasa total

seca de cada órgano y se sumaron entre sí; esta suma se dividió por la biomasa total de los órganos aéreos:

$$C_{\text{aérea}} = (\text{BioM}_{\text{hoja}} \times C_{\text{hoja}} + \text{BioM}_{\text{tallo}} \times C_{\text{tallo}}) / (\text{BioM}_{\text{hoja}} + \text{BioM}_{\text{tallo}})$$

Donde C es concentración de Pb en el órgano indicado en el subíndice que corresponda, y BioM es la biomasa seca producida en el órgano indicado en el subíndice que corresponda.

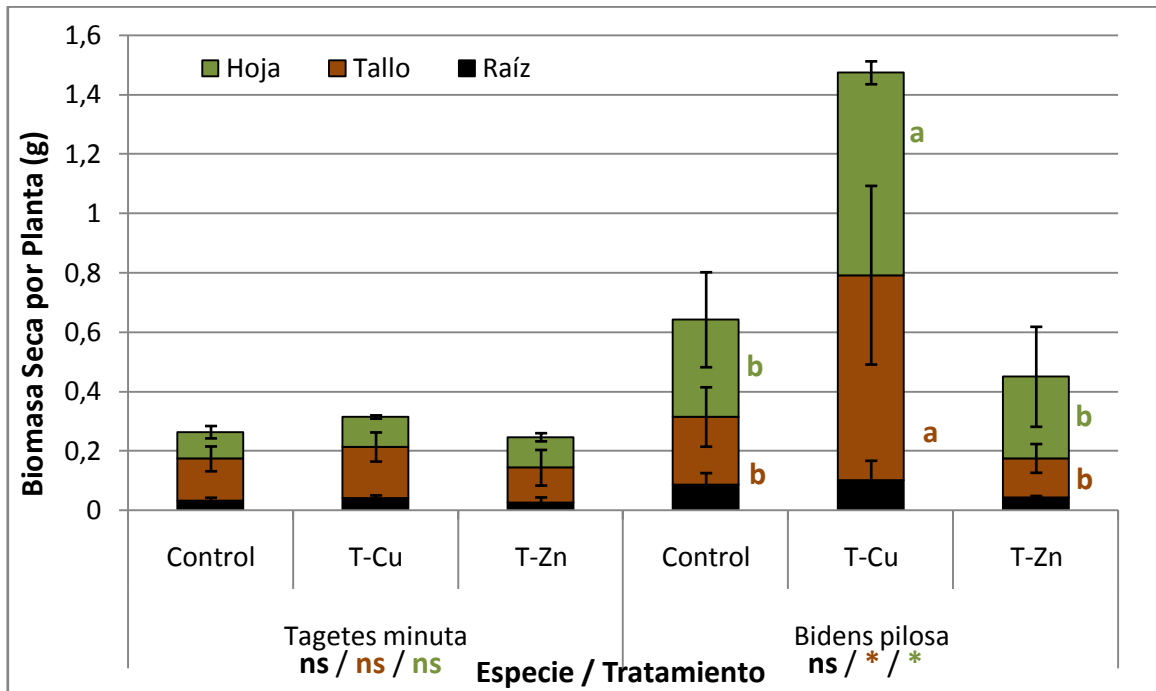
6.3. Resultados

6.3.1. Biomasa

Los resultados de la producción de biomasa por planta y por órgano en cada especie se muestran en la Figura 6.1. El agregado de Zn o de Cu en el suelo no tuvo efecto alguno sobre la cantidad de biomasa producida por órgano y por planta de *T. minuta*. Sin embargo, el agregado de Cu en suelo produjo un incremento estadísticamente significativo de la biomasa aérea (tallo y hojas) en *B. pilosa*, aunque no sobre la biomasa de la raíz. El agregado de Zn no tuvo efecto alguno sobre la producción de biomasa en esta especie.

En cuanto a la distribución de la biomasa entre los distintos órganos, ambas especies producen mayor cantidad de biomasa aérea que radical. *Bidens pilosa* presentó mayor cantidad de biomasa en el follaje que en el tallo, mientras que *Tagetes minuta* a la inversa. Por otro lado la biomasa producida por planta para *B. pilosa* fue significativamente superior a la producida por *T. minuta*.

Figura 6.1. Efecto del agregado de Zn y Cu a los suelos contaminados con Pb sobre la biomasa por planta y por órgano en *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa*.



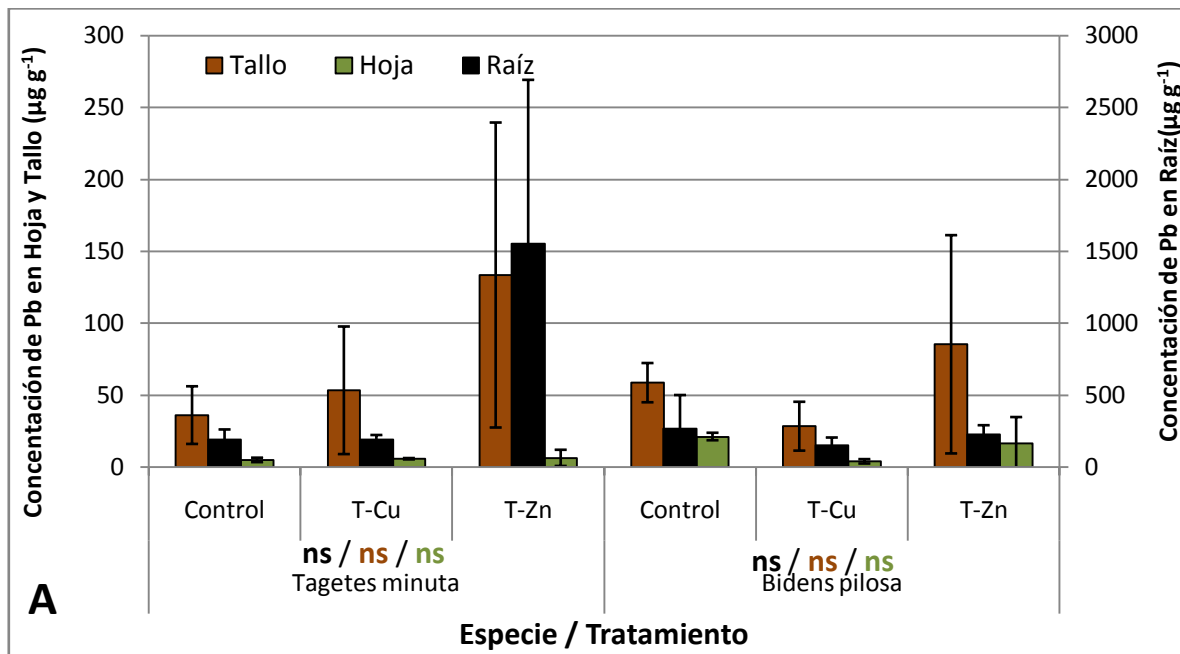
Niveles de significancia: ns, no significativo, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001. Letras diferentes indican diferencias significativas. Los colores de las letras indican el órgano vegetal al que corresponde el análisis.

6.3.2. Concentración de Pb, Zn y Cu en los órganos vegetales

En la Figura 6.2. se presentan las concentraciones de Pb (A), Cu (B) y Zn (C) en raíz, tallo y hojas de *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* cuando crecen en suelos contaminados con Pb sin ningún tratamiento (Control), con el agregado de 100 mg kg⁻¹ de Cu (T-Cu) o con el agregado de 100 mg kg⁻¹ de Zn (T-Zn).

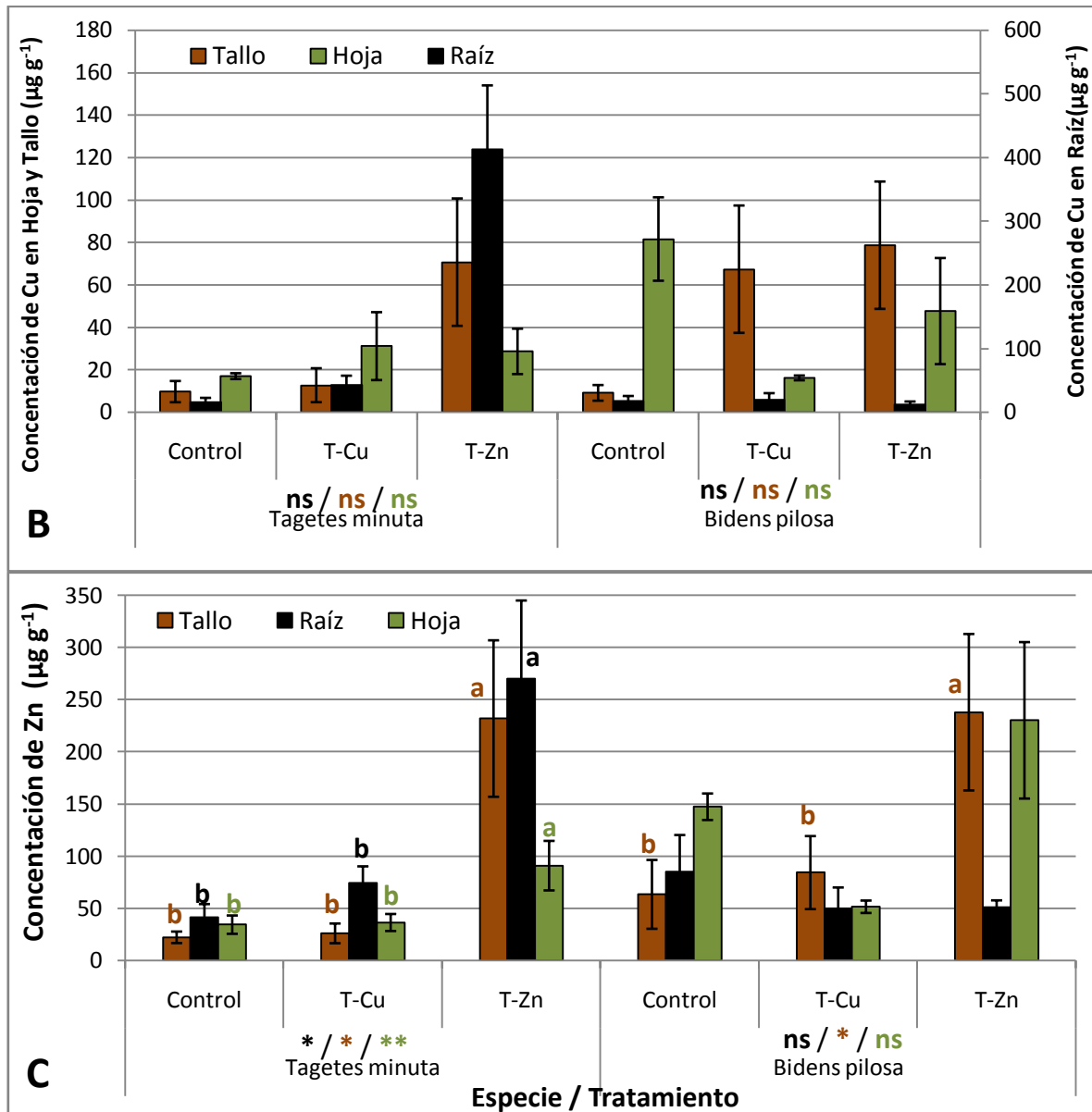
Las concentraciones de Pb (Figura 6.2.A) en los órganos vegetales de ambas especies no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos, no obstante el agregado de Cu y Zn incrementó la variabilidad de estos resultados. Puede observarse una tendencia de incremento de Pb en raíces y tallos de *T. minuta* y en tallos de *B. pilosa* cuando el suelo es enriquecido con Zn.

Figura 6.2. Concentraciones de Pb (A), Cu (B) y Zn (C) en raíz, tallo y hojas de *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* cuando crecen en suelos contaminados con Pb sin tratamiento (Control), con el agregado de 100 mg kg⁻¹ de Cu (T-Cu) o Zn (T-Zn).



Niveles de significancia: ns, no significativo, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001. Letras diferentes indican diferencias significativas. Los colores de las letras indican el órgano vegetal al que corresponde el análisis.

Figura 6.2. (Continuación). Concentraciones de Pb (A), Cu (B) y Zn (C) en raíz, tallo y hojas de *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* cuando crecen en suelos contaminados con Pb sin tratamiento (Control), con el agregado de 100 mg kg⁻¹ de Cu (T-Cu) o Zn (T-Zn).



Niveles de significancia: ns, no significativo, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001. Letras diferentes indican diferencias significativas. Los colores de las letras indican el órgano vegetal al que corresponde el análisis.

Las concentraciones de Cu (Figura 6.2.B) en los órganos vegetales de ambas especies no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos dados los grandes desvíos encontrados. No obstante pueden analizarse algunas tendencias llamativas. El agregado de

Cu al suelo no incrementó las concentraciones de este mismo metal en órganos de *T. minuta*, pero sí lo hizo el agregado de Zn. En el caso de *B. pilosa*, el agregado de Cu al suelo disminuyó el contenido de éste en las hojas, en la misma medida en que aumentó el contenido en tallos, lo que estaría sugiriendo que al haber un exceso de Cu en suelo, su translocación de tallo a hojas se ve reducida. Al agregar Zn al suelo, las concentraciones de Cu en tallos aumentan sin modificarse la translocación a las hojas.

Las concentraciones de Zn (Figura 6.2.C) en todos los órganos de *T. minuta* se vieron incrementadas significativamente por el agregado de Zn al suelo y no fueron afectadas por el agregado de Cu. En *B. pilosa* esta tendencia fue clara solo para la concentración de Zn en tallos.

A fin de analizar la relación entre la concentración de Pb, Zn y Cu en los órganos de las plantas de las dos especies se realizó un análisis de correlación de Spearman. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.1.

Los resultados de los análisis de correlación muestran que la acumulación de Pb en hojas de *Bidens pilosa* presenta sinergia con la de Cu y Zn en este órgano. En *Tagetes minuta*, cuando Cu se acumula en el tallo, es decir que no ingresa a la hoja, el contenido de Pb en las hojas disminuye, lo que indicaría que la translocación de Pb está ligada a la de este metal esencial. En cuanto a la concentración de Pb en los tallos de ambas especies se encontró que la misma se ve incrementada por la presencia de Zn en la hoja, señalando nuevamente un fenómeno de sinergismo. En *B. pilosa*, el contenido de Pb en raíces mostró una correlación positiva con la concentración Zn en raíces.

Tabla 6.1. Coeficientes de correlación de Spearman (bajo la diagonal) y sus valores de probabilidad (sobre la diagonal) entre el contenido de Pb, Zn y Cu en los órganos vegetales de *Bidens pilosa* y *Tagetes minuta*.

<i>Tagetes minuta</i>									
	Pb Hoja	Cu Hoja	Zn Hoja	Pb Tallo	Cu Tallo	Zn Tallo	Pb Raiz	Cu Raiz	Zn Raiz
Pb Hoja	1	0,54	0,85	0,92	0,03	0,96	0,51	0,74	0,74
Cu Hoja	0,22	1	0,92	0,54	0,93	0,57	0,09	0,17	0,24
Zn Hoja	-0,07	0,03	1	0,02	0,35	0,11	0,08	0,02	0,05
Pb Tallo	-0,03	0,22	0,8	1	0,16	0,03	0,04	0,06	0,03
Cu Tallo	-0,71	-0,03	0,36	0,51	1	0,2	0,97	0,51	0,54
Zn Tallo	-0,02	0,2	0,57	0,75	0,47	1	0,19	0,05	0,03
Pb Raiz	0,23	0,6	0,62	0,73	0,02	0,47	1	0,07	0,08
Cu Raiz	0,12	0,48	0,8	0,67	0,25	0,68	0,63	1	0,01
Zn Raiz	0,12	0,42	0,68	0,75	0,24	0,78	0,62	0,88	1
<i>Bidens pilosa</i>									
Columna1	Pb Hoja	Cu Hoja	Zn Hoja	Pb Tallo	Cu Tallo	Zn Tallo	Pb Raiz	Cu Raiz	Zn Raiz
Pb Hoja	1	0,01	0,03	0,1	0,35	0,67	0,71	0,14	0,71
Cu Hoja	0,98	1	0,02	0,09	0,51	0,78	0,64	0,17	0,85
Zn Hoja	0,78	0,83	1	0,02	0,71	0,26	0,74	0,4	0,48
Pb Tallo	0,58	0,6	0,82	1	0,35	0,16	0,71	0,22	0,96
Cu Tallo	-0,33	-0,23	0,13	0,33	1	0,26	0,92	0,54	0,54
Zn Tallo	-0,15	-0,1	0,4	0,5	0,4	1	0,42	0,89	0,42
Pb Raiz	-0,13	-0,17	0,12	0,13	0,03	0,28	1	0,05	0,03
Cu Raiz	-0,52	-0,48	-0,3	-0,43	0,22	-0,05	0,7	1	0,02
Zn Raiz	-0,13	-0,07	0,25	-0,02	0,22	0,28	0,77	0,82	1

Con el propósito de entender mejor la relación entre la acumulación y translocación de Pb, Zn y Cu en la dos especies, se realizaron regresiones lineales múltiples. Como el mayor interés desde la perspectiva de la fitoextracción de plomo es la concentración del contaminante en hojas y en tallos ya que ambos son fácilmente cosechables, estas fueron las variables dependientes en las regresiones. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.2.

Los resultados de los análisis de regresión muestran que la acumulación de Pb en hojas de las dos especies presenta sinergia con la de Cu y Zn en este órgano. En las mismas, cuando Cu y Zn se acumulan en el tallo el contenido de Pb en las hojas disminuye, lo que indicaría que la translocación de Pb está ligada a la de estos dos metales esenciales. En cuanto a la concentración de Pb en los tallos de ambas especies se encontró que la misma se

ve incrementada por la presencia en el mismo órgano tanto de Cu como de Zn para *B. pilosa*, y de Zn para *T. minuta*, señalando nuevamente un fenómeno de sinergismo.

Tabla 6.2. Resultados del análisis de regresión lineal múltiple para la concentración de Pb en hojas y relación entre el contenido de Pb, Zn y Cu en los órganos vegetales de *Bidens pilosa* y *Tagetes minuta*.

Especie	Variable	Modelo	R ²	N
<i>Tagetes minuta</i>	Pb _{Hoja}	$3,88^{**} - 0,05^{***} \cdot \text{Cu}_{\text{Tallo}} + 0,07^{***} \cdot \text{Zn}_{\text{Hoja}}$	0,88 ^{**}	9
	Pb _{Tallo}	$33^{*} + 0,44^{***} \cdot \text{Zn}_{\text{Tallo}}$	0,88 ^{**}	9
<i>Bidens pilosa</i>	Pb _{Hoja}	$0,18^{**} \cdot \text{Cu}_{\text{Hoja}} + 0,04^{**} \cdot \text{Zn}_{\text{Hoja}} - 0,02^{*} \cdot \text{Cu}_{\text{Tallo}}$	0,99 ^{***}	9
	Pb _{Tallo}	$0,49^{***} \cdot \text{Zn}_{\text{Tallo}} + 0,82^{***} \cdot \text{Cu}_{\text{Hoja}} - 0,24^{**} \cdot \text{Zn}_{\text{Hoja}}$	0,99 ^{***}	9
General	Pb _{Hoja}	$0,12^{***} \cdot \text{Cu}_{\text{Hoja}} + 0,06^{***} \cdot \text{Zn}_{\text{Hoja}} - 0,03^{**} \cdot \text{Cu}_{\text{Tallo}} - 0,01^{*} \cdot \text{Cu}_{\text{Raíz}}$	0,96 ^{***}	18
	Pb _{Tallo}	$21^{**} + 0,27^{***} \cdot \text{Zn}_{\text{Tallo}} + 0,03^{*} \cdot \text{Pb}_{\text{Raíz}}$	0,85 ^{**}	18

Niveles de significancia: ns, no significativo, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001.

6.3.3. Factor de Translocación

En la Figura 6.3. se presentan los resultados de los factores de translocación de Pb, Zn y Cu calculados para las dos especies estudiadas. El FT de Pb en *T. minuta* (Fig. 6.3. A) no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, aunque puede apreciarse una tendencia de disminución de éste cuando se agregó Zn al suelo y un ligero incremento (no significativo) con el agregado de Cu. Los FT para Zn y Cu en esta especie mostraron valores muy bajos por tratarse de micronutrientes, posiblemente debido a la presencia de altos niveles de Pb en el suelo. El agregado de Cu produjo una disminución de los FT de Zn y del mismo elemento, Cu. Por otra parte, el agregado de Zn disminuyó más fuertemente el FT de Cu mientras que no afectó su propio FT.

El agregado de Cu y Zn al suelo no produjo efectos estadísticamente significativos sobre los FT de Zn y Pb calculados para *B. pilosa* (Fig 6.3.B), no obstante puede apreciarse una tendencia de disminución en la translocación, la que se repite para los tres elementos cuando se agrega Cu al suelo. Esta especie no se mostró, en este caso, como una eficaz translocadora de Pb ya que FT < 1. Los otros dos elementos sí fueron translocados

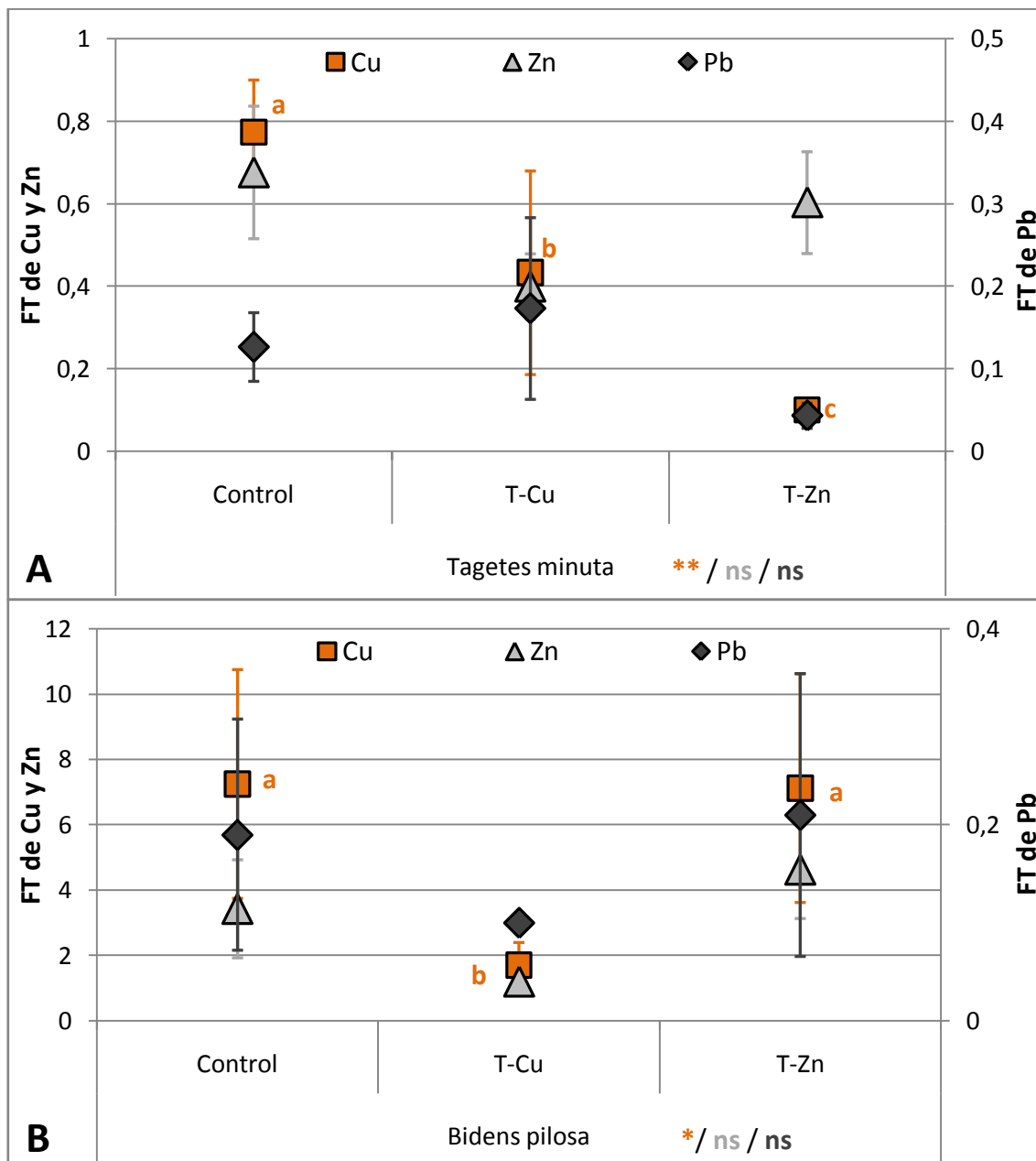
eficientemente lo que era esperable por su condición de micronutrientes, por tanto esenciales para las funciones vitales de la planta.

En la Tabla 6.3. se presentan los coeficientes de correlación de Spearman para los FT de Pb, Zn y Cu calculados en ambas especies. Para *Tagetes minuta* sólo correlacionaron significativamente los FT de Cu y Pb, haciéndolo de manera positiva con un coeficiente de 0,78. En *Bidens pilosa* las correlaciones entre los factores de translocación para los tres metales fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$), y positivas con coeficientes cercanos a 0,8. Es decir que mientras más se translocó un elemento, más se translocaron los otros. En la Figura 6.3.B puede apreciarse que en esta especie la respuesta de los FT para los tres elementos era similar.

Tabla 6.3. Coeficientes de correlación de Spearman (bajo la diagonal) y sus probabilidades (sobre la diagonal) entre los FT de Pb, Cu y Zn para *Bidens pilosa* y *Tagetes minuta*.

	<i>Tagetes minuta</i>			<i>Bidens pilosa</i>		
	FT Pb	FT Zn	FT Cu	FT Pb	FT Zn	FT Cu
FT Pb	1	0,42	0,03	1	0,03	0,01
FT Zn	-0,28	1	0,71	0,78	1	0,02
FT Cu	0,78	0,13	1	0,87	0,8	1

Figura 6.3. Efecto del agregado de Zn y Cu a suelos contaminados con Pb sobre los FT de Pb, Cu y Zn de A) *Tagetes minuta* y B) *Bidens pilosa*.



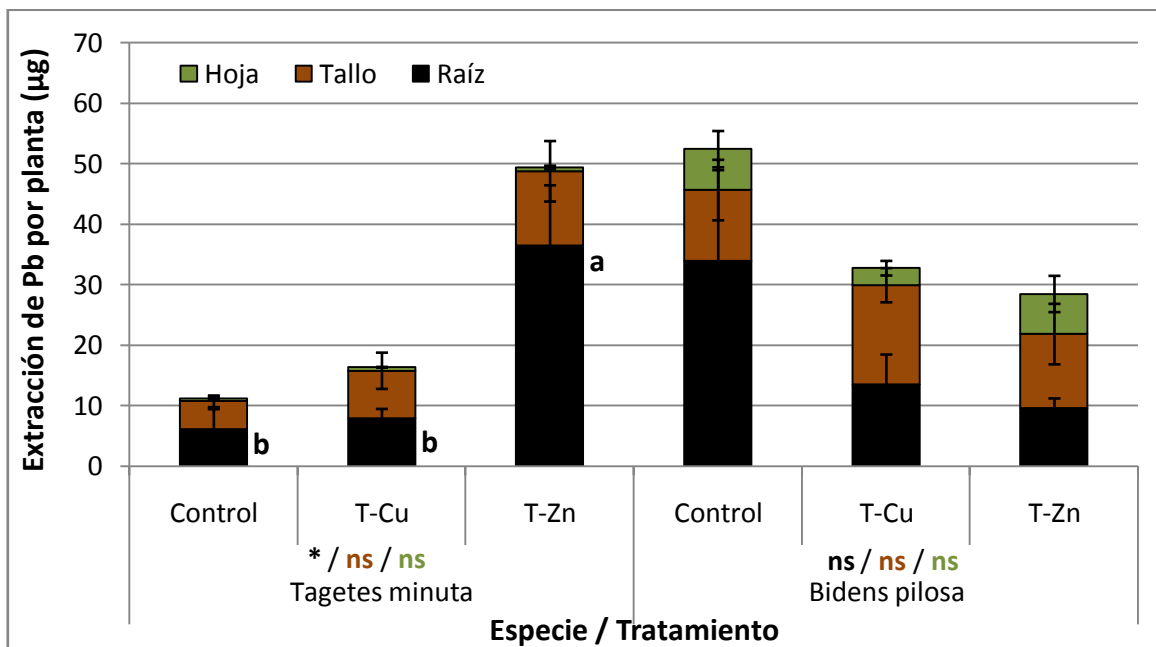
Niveles de significancia: ns, no significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Letras diferentes indican diferencias significativas. Los colores de las letras indican el elemento.

6.3.4. Extracción de plomo por planta y por órgano

En la Figura 6.4. se muestran los resultados para la extracción de Pb por planta y por órgano en ambas especies después de haber sido cultivadas en suelos enriquecidos con Cu y

Zn, además de contaminados por Pb. Debido a que se encontraron grandes desvíos, no fue posible detectar diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los análisis de la varianza. Aun así, se observó que el agregado de Zn en suelo produjo un incremento significativo de la extracción de Pb por planta en *T. minuta*, lo que lleva a postular una sinergia en la incorporación de ambos metales en esta especie. El mayor aumento en la absorción se encontró en la raíz, y las concentraciones mostraron diferencias significativas entre tratamientos. Este patrón no fue el observado en *B. pilosa*. La extracción neta de Pb por planta en esta especie, no presentó diferencias estadísticamente significativas, y la tendencia encontrada parece indicar una limitación de la extracción de Pb debida al agregado de Zn y Cu al suelo. Del mismo modo que para *T. minuta*, este efecto fue más evidente en raíz.

Figura 6.4. Efecto del agregado de Zn y Cu en suelo sobre la extracción total de Pb por planta y órgano de *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa*.



Niveles de significancia: ns, no significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Letras diferentes indican diferencias significativas. Los colores de las letras indican el órgano vegetal al que corresponde el análisis.

La extracción total de Pb por planta en suelos Control, es decir sin el agregado de Cu y Zn, fue superior en *Bidens pilosa*. No obstante, el agregado de estos metales tuvo un efecto negativo en la eficiencia de esta especie y los resultados encontrados en este capítulo para

las tasas de extracción de Pb, fueron inferiores a los encontrados en los experimentos realizados con anterioridad (Capítulos III a V).

6.4. Discusión

A diferencia de lo observado en los resultados de experimentos anteriores, ante el agregado de Cu y Zn, las especies se comportaron de manera marcadamente diferente entre sí. *Bidens pilosa* desarrolló mayor biomasa debido al agregado de Cu, al mismo tiempo que acumuló menos Cu, Pb y Zn en tejidos aéreos, resultado que se constata al calcular los FT y la extracción total de Pb por planta. La extracción neta no se vio afectada por los tratamientos en términos de significancia estadística, aunque se encontró una asociación positiva entre la translocación desde la raíz a la parte aérea para los tres metales. Esto podría indicar que Pb, Zn y Cu son translocados por los mismos mecanismos o vías. Lo que es más, si el Cu se acumula en el tallo y no se transloca a la hoja, tampoco lo hace el Pb. El aumento en el contenido de Zn en cualquier parte de la planta estimuló la absorción y translocación de Pb en la misma. Resulta contradictorio que el aumento de Cu y Zn en suelos produzca una disminución de la extracción de Pb (tendencia que ya había sido observada a campo y que fue reportada en el Capítulo II), al mismo tiempo que la acumulación de estos metales por la planta cause el efecto contrario.

Esta respuesta no esperada, podría estar relacionada con la toxicidad de estos elementos esenciales cuando son incorporados por las plantas por encima de sus necesidades fisiológicas; donde, según sus concentraciones, provocarían alteraciones metabólicas en las especies menos tolerantes. Los niveles de toxicidad para ellos son muy variables de una especie vegetal a otra, si bien se puede considerar que en la mayoría se encuentran entre 200 y 300 $\mu\text{g Zn g}^{-1}$ PS y entre 15 y 20 $\mu\text{g Cu g}^{-1}$ PS (Påhlsson, 1989). Estas concentraciones fueron ampliamente superadas en este estudio, fundamentalmente las de Cu. En principio, el exceso de Cu y Zn en el suelo podría causar una respuesta en las raíces de *B. pilosa*, y luego sus efectos podrían propagarse al resto de la planta. A fin de evaluar cuál era el factor más importante se realizó una regresión múltiple incluyendo como variables regresoras las concentraciones de los tres elementos en los tres órganos, utilizando el modelo “Stepwise” como selector de variables, los resultados son consistentes

con lo encontrado en las correlaciones. Para *B. pilosa*, el modelo finalmente arrojó una única variable de peso: concentración de Zn en raíz, la que determinó la extracción total de Pb por planta con un coeficiente de regresión corregido significativo ($p < 0,001$) de 0,89. Esta relación indica que a mayor contenido de Zn en raíces, fue mayor la extracción total de Pb por planta, es decir que los resultados muestran una relación sinérgica entre estos metales una vez que han ingresado a la planta, aunque este comportamiento no se observa cuando los niveles de Zn aumentan en suelo. Esto rechazaría la hipótesis planteada en el Capítulo II, la cual relacionaba la falta de disponibilidad de Cu o Zn como causal de la acumulación de Pb. La bibliografía informa sobre estudios de interacción entre metales que son micronutrientes, como Cu y Zn, para los cuales se ha encontrado que en algunas especies y situaciones puede ser antagónica (Kabata Pendias y Pendias, 1984) y en otras sinérgica (Luo y Rimmer, 1995; Yoon et al., 2006). En el presente estudio la correlación positiva entre la translocación de Zn y Cu indica una interacción sinérgica de ambos en *B. pilosa*. Con respecto a Pb, los estudios son escasos y con resultados no muy claros, Kabata Pendias y Pendias (1984) y Yoon et al. (2006) proponen que la interacción entre Pb y Zn posiblemente sea antagonista. Para *B. pilosa* los resultados parecen confirmar este antagonismo solo en el enriquecimiento del suelo con Zn, mostrando que este es un elemento disparador de cambios metabólicos en esta especie, mientras que el agregado de Cu al suelo no desencadenó una respuesta marcada en la incorporación y translocación de los otros elementos, aunque sí es un micronutriente de importancia para la especie ya que incrementó la biomasa.

Por su parte, *T. minuta* no mostró cambios en la producción de biomasa como respuesta a los tratamientos. No obstante, el agregado de Zn en suelos aumentó la concentración de Pb en raíces y tallos, aunque al mismo tiempo redujo el FT de Pb. La extracción total de plomo por planta se vio fuertemente incrementada; aunque se vio reducido el factor de translocación, el cual determinó que la extracción estuviese localizada principalmente en la raíz. De todos modos las regresiones múltiples y las correlaciones mostraron que Pb se moviliza junto con Zn (Tabla 6.1.) y Cu (Tabla 6.2.). Los resultados para la regresión múltiple con selección de variables en esta especie, mostraron una única variable de peso (concentración de Cu en raíz), la que determinó la extracción total de Pb por planta con un coeficiente de regresión significativo ($p < 0,001$) de 0,98. Esta relación

muestra que a mayor contenido de Cu en raíces, mayor extracción total de Pb por planta (mayoritariamente en raíces).

Los experimentos realizados en este estudio no permitieron aumentar los valores de extracción de Pb por *T. minuta* y *B. pilosa* como para proponer su empleo en proyectos de fitorremediación de suelos contaminados con plomo. No obstante, aportaron conocimientos sobre la interacción de metales presentes en los suelos con Pb y analizar fenómenos de sinergia o antagonismo, los que no habían sido estudiados hasta el momento. La incorporación de Zn y Cu en las plantas parece ser un hecho muy importante en la acumulación y translocación de Pb, y si bien existen antecedentes previos sobre la incorporación de estos elementos debido a que son micronutrientes, no existe información sobre la influencia que estos tienen sobre la incorporación y acumulación de Pb, un elemento tóxico para la mayoría de las especies vegetales. Nuestros resultados muestran la sinergia en la acumulación de Pb con Zn, o de Pb con Cu, según la especie, lo que permitiría emplear este conocimiento a fin de mejorar las condiciones de cultivo y potenciar la capacidad fitoextractora de Pb en *T. minuta* y *B. pilosa* cuando se usen para remediar suelos contaminados. Por ejemplo, está documentado que la presencia conjunta de un exceso de Cu y Zn en suelos potencia la toxicidad de ambos por separado, reduciendo la producción de biomasa y la incorporación de metales como Fe y Mn (Luo y Rimmer, 1995). Esto, junto con los resultados obtenidos en este trabajo, indicaría que el enriquecimiento en Zn en forma de Zn^{+2} podría ser empleado con esta finalidad (Knight et al., 1998).

6.5. Conclusiones

En este capítulo se estudió el efecto de la competencia a nivel suelo y planta entre Pb, Cu y Zn. El agregado de Zn al suelo mostró un mayor efecto en la acumulación de Pb de ambas especies, habiéndose detectado una posible sinergia entre ambos metales en las dos especies. En términos de extracción total de Pb por planta, sólo se observó un incremento en *T. minuta* cuando se agregó Zn al suelo, aunque el Pb incorporado se alojó preferentemente en la raíz.

7. Capítulo VII.

Efecto de la aplicación de auxinas sobre la eficiencia fitoextractora de plomo en *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa*.

Resumen

La principal barrera contra el ingreso de Pb a la planta reside en la raíz, más específicamente en la banda de Caspary. Esto presupone que el metal ingresa al cortex radical pero no al cilindro central donde está el xilema, evitándose así la translocación a la parte aérea en la mayoría de las especies. Las partes más jóvenes de la raíz, cercanas al meristema, no presentan un completo desarrollo de la banda de Caspary y por estar en proceso de elongación sus paredes celulares son más delgadas que las del resto de la raíz. De este modo el ingreso de Pb por estos sectores de la raíz se encuentra facilitado. No obstante, uno de los principales efectos fitotóxicos del Pb es la reducción en el crecimiento de la raíz como así también su suberificación. Estos dos efectos tienden a evitar el ingreso de Pb en la planta. En este contexto se sugiere que el uso de metodologías que incrementen la velocidad de crecimiento de las raíces, puede ser muy importante en la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados.

En este capítulo el objetivo fue evaluar el efecto del agregado de auxinas (hormonas de crecimiento vegetal) sobre la extracción de Pb por parte de *Bidens pilosa* y *Tagetes minuta* cuando crecen en suelos con concentraciones crecientes de Pb. Se observó que las especies estudiadas son receptivas a la aplicación de auxinas, y que los efectos esperados se cumplieron en los suelos Control. No obstante, el efecto tóxico del Pb no pudo ser compensado con este tratamiento hormonal, habiéndose encontrado que las tasas de extracción neta de plomo en estas especies no fueron afectadas por el uso de auxinas. Por otra parte, se encontraron asociaciones importantes entre el uso de auxinas, la liberación de exudados por parte de las plantas y la capacidad extractiva de plomo que presentan los mismos.

7.1. Introducción

La remediación de suelos contaminados con Pb utilizando la tecnología de fitoextracción es un objetivo que no ha sido alcanzado hasta el momento a nivel global pese al esfuerzo de numerosas investigaciones científicas. La bibliografía indica una imposibilidad generalizada en la translocación de este contaminante hacia la parte aérea de

la mayoría de las plantas, siendo esto la mayor dificultad a sortear para la implementación de la fitoextracción de Pb (Baker, 1981; Pourrut et al., 2011). En este contexto, la principal barrera biológica contra el ingreso de Pb a la planta reside en la raíz, más específicamente en la banda de Caspary (Pourrut y col, 2011). Esto presupone que el metal ingresa al cortex radical pero no al cilindro central donde está el xilema, evitándose así la translocación a la parte aérea. Las partes más jóvenes de la raíz, cercanas al meristema, no presentan un completo desarrollo de la banda de Caspary y por estar en proceso de elongación sus paredes celulares son más delgadas que las del resto de la raíz. De este modo el ingreso de Pb a la planta se encuentra facilitado o presenta un menor impedimento en estos sectores de la raíz (Seregin y Ivanov, 1997). No obstante, uno de los principales efectos fitotóxicos del Pb es la reducción del crecimiento de la raíz como así también su suberificación. Estos dos efectos tienden a reprimir el ingreso de Pb en las plantas (Gleeson, 2007). En el marco de esta problemática, Liphadzi et al. (2006) sugieren el uso de metodologías que produzcan un mayor crecimiento de las raíces, un aspecto que sería muy importante en la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados. De esta manera, estos autores demostraron que el uso de auxinas incrementa la extracción de Pb de suelos contaminados por la especie *Helianthus annuus*. No obstante, estos resultados no se observaron en otras especies. En general, los estudios sobre el posible efecto de la aplicación de fitohormonas para aumentar la capacidad fitoextractora están acotados a determinadas condiciones experimentales (Barbafieri y Tassi, 2011). En este capítulo se propuso como hipótesis que las fitohormonas con efecto inductor o promotor del crecimiento pueden favorecer la tasa de extracción neta de Pb por parte de las especies estudiadas mediante un aumento de su biomasa y mediante una reducción de los efectos fitotóxicos del metal. Así, al adicionar auxinas como tratamiento se esperó encontrar una mayor biomasa vegetal y extracción neta de Pb.

El objetivo del presente capítulo fue evaluar el efecto del agregado de auxinas (hormonas de crecimiento vegetal) sobre la extracción de Pb por *Bidens pilosa* y *Tagetes minuta* cuando crecen en suelos con concentraciones crecientes de Pb.

7.2. Materiales y Métodos

7.2.1. Suelos

Los suelos utilizados en esta experiencia fueron obtenidos de las inmediaciones de la fundición de Bouwer, en sitios muy próximos al predio donde ésta funcionó. Estos correspondieron a los denominados y descriptos en el Capítulo II como “5” y “2”; también se recolectaron suelos en el sitio denominado y descripto en el Capítulo I como “Control Interno”. Las propiedades de los tres suelos utilizados pueden observarse en las Tablas 1.1., 1.2., y 2.1., y la acumulación de Pb en las especies de plantas que crecían en él se presentó en la Tabla 2.3.

Para su recolección se removieron manualmente la cobertura vegetal y los objetos extraños de la superficie. Utilizando pala de acero inoxidable se recolectó suelo superficial (15 cm de profundidad), y se lo almacenó en bolsas plásticas. El suelo recolectado en cada sitio fue fraccionado en 2 partes iguales a fin de representar las siguientes condiciones en los tratamientos:

- Suelo del sitio 2, el cual se caracteriza por una elevada concentración de Pb (2722 mg kg⁻¹ PS en la fracción pseudototal y 2429 mg kg⁻¹ PS en la fracción extraíble con HCl 0,5M). En adelante “Alta”.
- Suelo del sitio 2 con Auxinas. En adelante “Alta con Auxinas”.
- Suelo del sitio 5, el cual se caracteriza por una concentración considerada intermedia de Pb (1187 mg kg⁻¹ PS en la fracción pseudototal y 1497 mg kg⁻¹ PS en la fracción extraíble con HCl 0,5M). En adelante “Media”.
- Suelo del sitio 5 con Auxinas. En adelante “Media con auxinas”.
- Suelo del sitio Control, el cual presenta valores bajos de Pb (naturales en ese tipo de suelo) que rondan los 9,9 mg kg⁻¹ PS en la fracción pseudototal y 9,1 mg kg⁻¹ PS en la fracción extraíble con HCl 0,5M. En adelante “Control”.
- Suelo del sitio Control con Auxinas. En adelante “Control con Auxinas”.

7.2.2. Material vegetal

Semillas de *B. pilosa* y *T. minuta* fueron recolectadas en el predio donde operó una fundición de Pb en la localidad de Bouwer. Las mismas se sometieron a un proceso de imbibición en agua corriente durante 24 horas. Las semillas ya imbibidas fueron esterilizadas con NaClO 1% V/V mediante agitación manual durante 10 min, luego se lavaron con agua destilada y fueron germinadas en cápsulas de Petri sobre papel de filtro humedecido con agua destilada (4 días en oscuridad).

7.2.3. Diseño experimental

Una vez que las plántulas tuvieron al menos un par de hojas verdaderas, se trasladaron a macetas tipo parcela de 15 L de capacidad. Se colocaron 24 plantas en cada maceta y la duración del experimento fue de 12 semanas. Se midió la altura de cada planta y el número de nudos semanalmente. La aplicación de auxinas, ácido indol-3-acético (IAA), se realizó en suelo y sobre las hojas según Liphadzi et al. (2006). Se realizaron 3 aplicaciones: a la sexta, octava y décima semana de cultivo de las plantas. Una vez completada la decimosegunda semana se realizó la cosecha, que tuvo lugar en dos fases. En una primera fase se extrajeron cuidadosamente 6 plantas completas de cada parcela. Las mismas fueron agrupadas de a dos. Sus raíces se lavaron con agua corriente y luego con agua milli-Q. Estos pares de plantas fueron colocadas en tubos falcon de 50 mL con 30 mL de agua milli-Q cubriendo sus raíces. Allí permanecieron por 24 horas y el líquido residual fue llevado a un volumen final de 30 mL. Esta disolución se guardó como fuente de exudados radicales extraídos (Niu et al., 2011). Los exudados fueron luego utilizados como medio de extracción de metales pesados en suelos. A los tres pares de plantas utilizadas para la obtención de exudados se les agregaron tres pares más extraídos directamente de las parcelas, es decir sin haber pasado por el proceso de recolección de exudados. Así se obtuvieron tres réplicas compuestas de 4 plantas cada una para cada tratamiento.

Las muestras vegetales fueron separadas en raíces, tallos y hojas, los que fueron lavados con agua milli-Q y las raíces, además, fueron sonicadas. Luego, las muestras fueron llevadas a estufa a 60 °C hasta obtener peso seco constante. Se determinó la biomasa

seca total producida por planta y por órgano, las muestras fueron trituradas con molinillo de acero inoxidable y conservadas en bolsas plásticas herméticas hasta su posterior análisis.

7.2.4. Determinación de la concentración de metales pesados en órganos vegetales

La concentración de Pb en los órganos de las plantas se determinó de acuerdo a Wannaz et al. (2011). Para esto se tomó 1 g PS de las muestras trituradas de raíces, tallos y hojas de *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* correspondientes a cada tratamiento para su análisis por reflexión total de fluorescencia de Rayos X (TXRF) usando radiación sincrotrón. El material vegetal fue reducido a cenizas en mufla a 450 °C por 4 h, estas fueron digeridas con 3 mL de HNO₃ calidad analítica a 25 ± 2 °C. El residuo sólido se separó por centrifugación, y se ajustó el volumen del sobrenadante a 5 mL con agua Milli-Q. Después, se añadieron 10 ppm de una solución de Ga como patrón interno. Se tomaron alícuotas de 5 µL de esta solución y se las secó sobre un soporte de acrílico. Se prepararon soluciones estándar con concentraciones conocidas de Pb⁺² (también con Ga como patrón interno) para la calibración del sistema. Las muestras fueron medidas 200 s, utilizando la configuración de reflexión total montada en la línea de luz de fluorescencia de rayos X del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS), Campinas, SP, Brasil. Para ello, un haz policromático de aproximadamente 5 mm de ancho y 0,1 mm de altura se utilizó para la excitación. Para la detección de rayos X, se utilizó un detector de Si (Li) con una resolución de energía de 165 eV a 5,9 keV.

7.2.5. Determinación del poder extractivo de los exudados

Los exudados recolectados fueron utilizados para su evaluación como medio de extracción de metales en los suelos contaminados con Pb. Para ello, 17 mL de los exudados provenientes de plantas correspondientes a cada tratamiento fueron mezclados con 1 g de suelo del mismo origen que el del tratamiento. Se los agitó durante 6 horas de la manera descrita para la extracción de la fracción disponible de metales en suelo (Tessier et al., 1979), luego se centrifugó y el sobrenadante fue filtrado y conservado para la medición de metales por TXRF siguiendo la misma metodología que la informada para plantas.

También se evaluaron posibles mecanismos de aclimatación de las especies. Para ello los exudados recolectados de individuos que crecieron en un suelo se utilizaron como medio de extracción en un suelo diferente.

Para poder descontar el poder extractor del medio en que se prepararon las disoluciones de los exudados se realizaron controles con el mismo tratamiento, pero sin plantas. Para ello se colocaron tubos falcon de 50 mL con 30 mL de agua milli-Q, y luego de 24 horas, este medio acuoso fue utilizado también como medio de extracción para los tres suelos utilizados.

7.2.6. Control de calidad

Como control de calidad se utilizaron blancos y materiales certificados. Los mismos fueron preparados de la misma manera que las muestras. El material certificado utilizado fue "CTA-OTL-1" (hojas de tabaco oriental, Instituto de Química y Tecnología Nuclear, OIEA). Los porcentajes de recuperación para el material certificado vegetal fueron de $86 \pm 7\%$ para Pb, $81 \pm 3\%$ para Cu, $84 \pm 3\%$ para Co, $86 \pm 5\%$ para Ni, $86 \pm 8\%$ para Fe, $85 \pm 2\%$ para Zn, y $84 \pm 3\%$ para Mn, estos son porcentajes promedio y sus desvíos estándar expresados con respecto al valor declarado y teniendo en cuenta todas las determinaciones realizadas por TXRF en dicho material a lo largo de la tesis completa. Se encontró que los coeficientes de variación de los análisis entre replicados fueron inferiores al 10%.

7.2.7. Análisis de datos

7.2.7.1. Análisis estadísticos

Se utilizó el test de Shapiro-Wilks para evaluar la distribución normal de las variables. No se encontraron datos con distribución no normal. Sin embargo se presentó heteroscedasticidad, la que fue resuelta mediante la incorporación de la misma en el modelo usando Infostat /E acoplado a R para realizar un análisis de varianza (ANOVA). Por tratarse de un diseño experimental a dos factores (concentración de Pb en suelo y uso de Auxinas) se evaluó primero la interacción entre los mismos. Cada vez que el ANOVA indicó efectos significativos ($p < 0,05$), se llevó a cabo una comparación por pares de medias mediante el test de Tukey.

7.2.7.2. Factores de translocación y extracción total

Se calculó el factor de translocación desde la raíz a la parte aérea de las plantas (FT R-A), utilizando la relación de la concentración de Pb en raíces y en la parte aérea [FT R-A= $C_{\text{aérea}}/ C_{\text{raíz}}$] (Bu-Olayan y Thomas, 2009). Para obtener el valor de extracción de plomo por órgano y por planta se multiplicó la concentración de Pb encontrada en cada órgano por la biomasa seca producida por planta en ese órgano. Para obtener la concentración de Pb en la parte aérea, la concentración cuantificada en las hojas y tallos se multiplicó por la biomasa total de cada órgano y se sumaron entre sí; esta suma se dividió por la biomasa total de los órganos aéreos:

$$C_{\text{aérea}} = (\text{BioM}_{\text{hoja}} \times C_{\text{hoja}} + \text{BioM}_{\text{tallo}} \times C_{\text{tallo}}) / (\text{BioM}_{\text{hoja}} + \text{BioM}_{\text{tallo}})$$

Donde C es concentración de Pb en el órgano indicado en el subíndice que corresponda, y BioM es la biomasa seca producida en el órgano indicado en el subíndice que corresponda.

7.3. Resultados y Discusión

7.3.1. Crecimiento

En la Figura 7.1. se muestra la respuesta en los parámetros de crecimiento de *T. minuta* ante los distintos tratamientos. El crecimiento en altura de la planta no se mostró muy afectado por las auxinas cuando las plantas crecieron en suelos enriquecidos en Pb (tratamientos con concentración Media o Alta). Sin embargo hubo una tendencia de aumento en la altura por el uso de auxinas cuando las plantas crecieron en suelos Control. Si se comparan las alturas de las plantas que crecieron con diferentes concentraciones de Pb en suelo, se puede observar que en el suelo Control las plantas detienen su crecimiento en la décima semana, mientras que cuando el suelo está contaminado con Pb el crecimiento perdura algunas semanas más. En la Tabla 7.1. se muestran los resultados de la comparación (ANOVA) de la altura alcanzada por las plantas en la última semana de experimento. Sólo se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos de Pb en suelo, con una altura mayor cuando el suelo no está contaminado. En cuanto al número de

nudos, el uso de auxinas produjo una disminución del mismo tanto cuando las plantas crecieron en suelo Control, así como cuando crecieron en suelos medianamente contaminados con Pb, pero no cuando la concentración de este metal en suelos fue muy elevada. Al comparar el número de nudos entre los tratamientos con concentraciones crecientes de Pb en suelos, se encontró la misma tendencia que para la altura (Tabla 7.1.).

Figura 7.1. Respuesta en los parámetros de crecimiento frente a la aplicación de auxinas en *Tagetes minuta*. A) Altura de la planta cuando crece en suelos muy contaminados con Pb. B) Altura de la planta cuando crece en suelos medianamente contaminados con Pb.

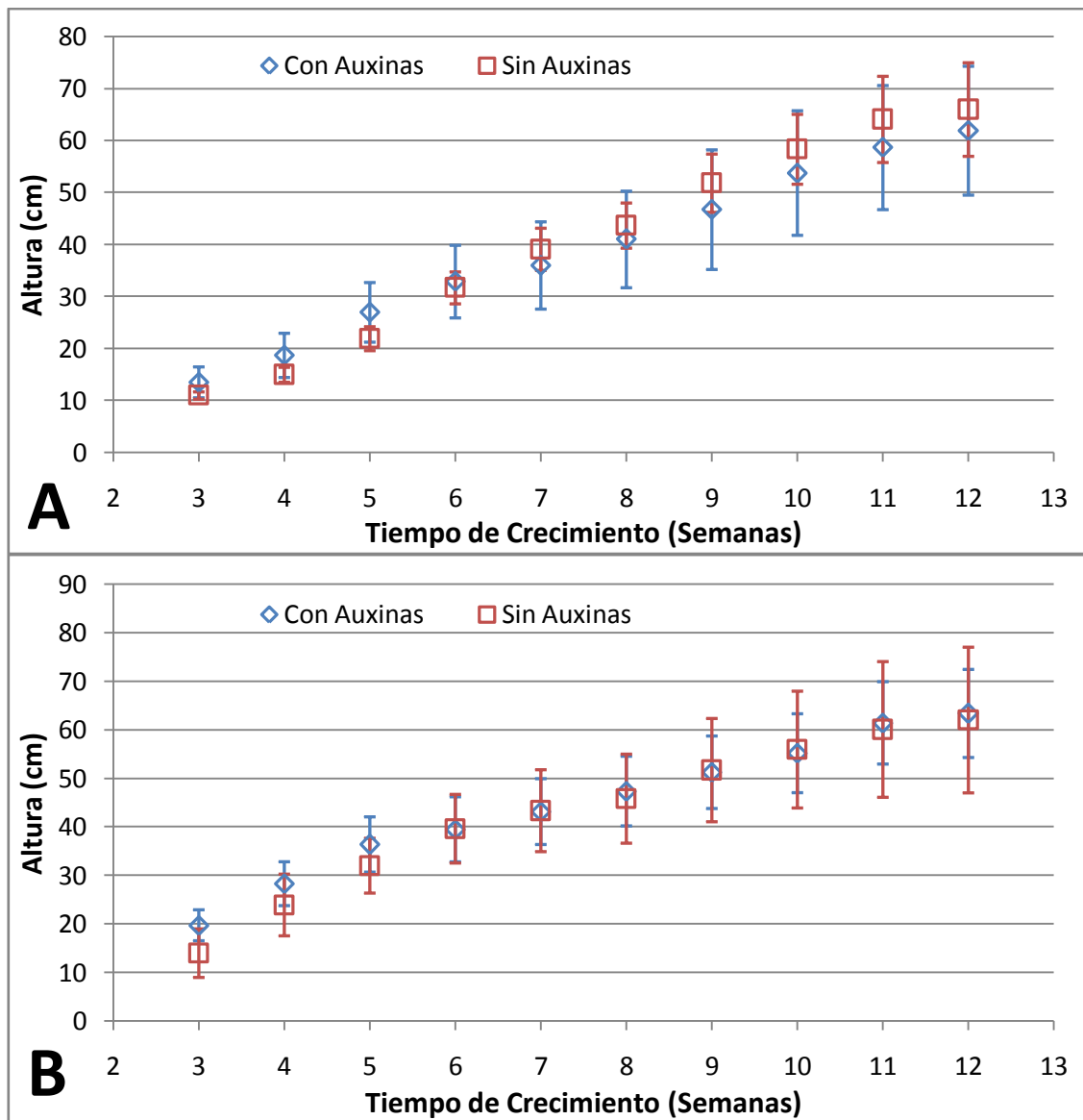


Figura 7.1. (Continuación). Respuesta en los parámetros de crecimiento frente a la aplicación de auxinas en *Tagetes minuta*. C) Altura de la planta cuando crece en suelos no contaminados con Pb (Control). D) Número de nudos de la planta cuando crece en suelos muy contaminados con Pb.

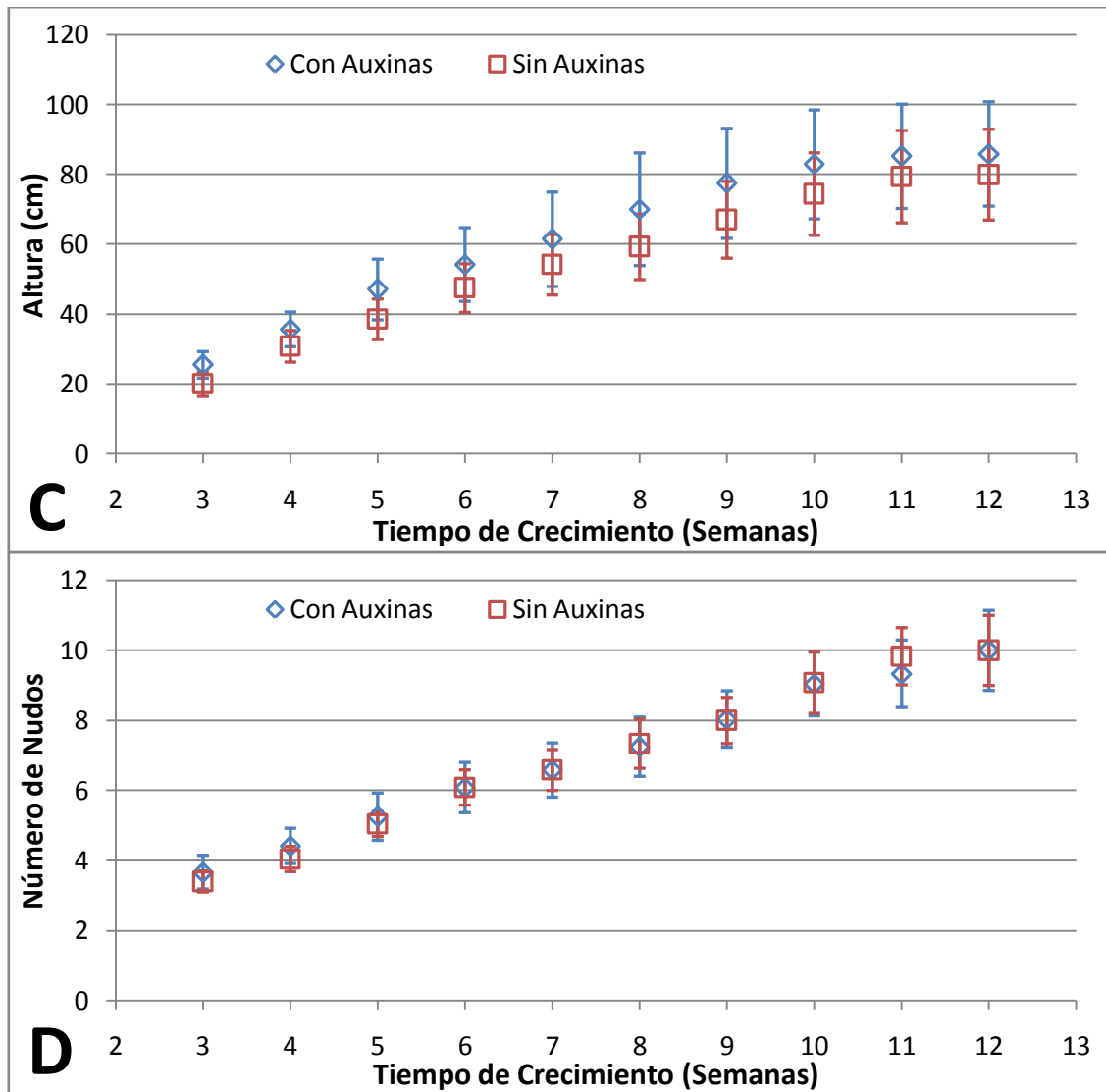


Figura 7.1. (Continuación). Respuesta en los parámetros de crecimiento frente a la aplicación de auxinas en *Tagetes minuta*. E) Número de nudos de la planta cuando crece en suelos medianamente contaminados con Pb. F) Número de nudos de la planta cuando crece en suelos Control.

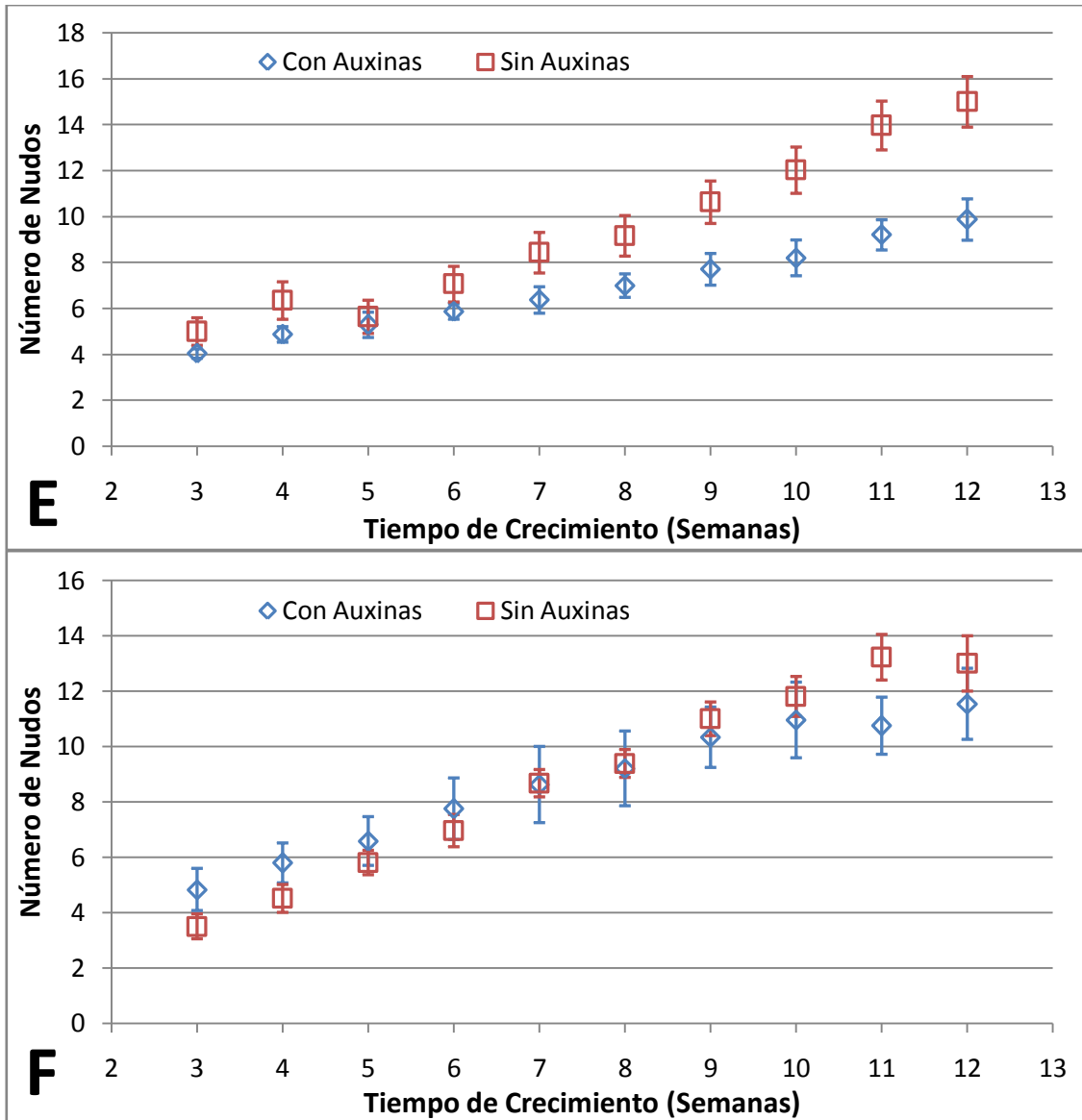


Tabla 7.1. Parámetros de crecimiento vegetal en *Tagetes minuta* medidos al finalizar el experimento con aplicación de Auxinas con diferentes niveles de Pb en suelo.

Pb en Suelo	Altura (cm) ± DS (p<0,001)	Número de nudos ± DS (p<0,001)
Alta	61,4 ± 2,3 b	9,58 ± 0,26 b
Media	60,7 ± 3,1 b	9,1 ± 0,2 c
Control	82,33 ± 1,76 a	10,69 ± 0,13 a

En la Figura 7.2. se muestran los resultados de la respuesta en los parámetros de crecimiento *B. pilosa* para los distintos tratamientos. En esta especie al igual que lo observado en *T. minuta*, el crecimiento en altura de la planta tampoco se mostró muy afectado por la aplicación de auxinas cuando las plantas crecieron en suelos enriquecidos en Pb (tratamientos con concentración de Pb Media o Alta), aunque en el tratamiento con alta concentración de Pb, la primera aplicación de auxinas durante la sexta semana produjo un incremento inicial de altura. Para esta especie también hubo un marcado efecto sobre el aumento en la altura debido al uso de auxinas cuando las plantas crecieron en suelo Control. Si se comparan las alturas alcanzadas por las plantas a las diferentes concentraciones de Pb en suelo, se puede observar que en el suelo Control las plantas detuvieron su crecimiento en la décima semana, mientras que cuando el suelo está contaminado con Pb el crecimiento perduró algunas semanas más. En la Tabla 7.2. se muestran los resultados de la comparación (ANOVA) de la altura alcanzada por las plantas en la última semana de experimento. Los dos factores presentaron interacción estadísticamente significativa por lo que no pudieron ser analizados por separado. La altura máxima se encontró en los suelos Control cuando se aplicaron auxinas, seguida por la de plantas que crecieron en el mismo suelo sin aplicación de auxinas, y luego por el resto de los tratamientos

En cuanto al número de nudos, el uso de auxinas produjo una disminución del mismo tanto en plantas que crecieron en suelo Control como cuando crecieron en suelos medianamente contaminados con Pb, pero no cuando la concentración de este metal en suelos fue muy elevada. Al comparar el número de nudos entre los tratamientos con Pb en suelo se encontró la misma tendencia que para la altura (Tabla 7.2.).

Figura 7.2. Respuesta en los parámetros de crecimiento frente a la aplicación de auxinas en *Bidens pilosa*. A) Altura de la planta cuando crece en suelos muy contaminados con Pb. B) Altura de la planta cuando crece en suelos medianamente contaminados con Pb.

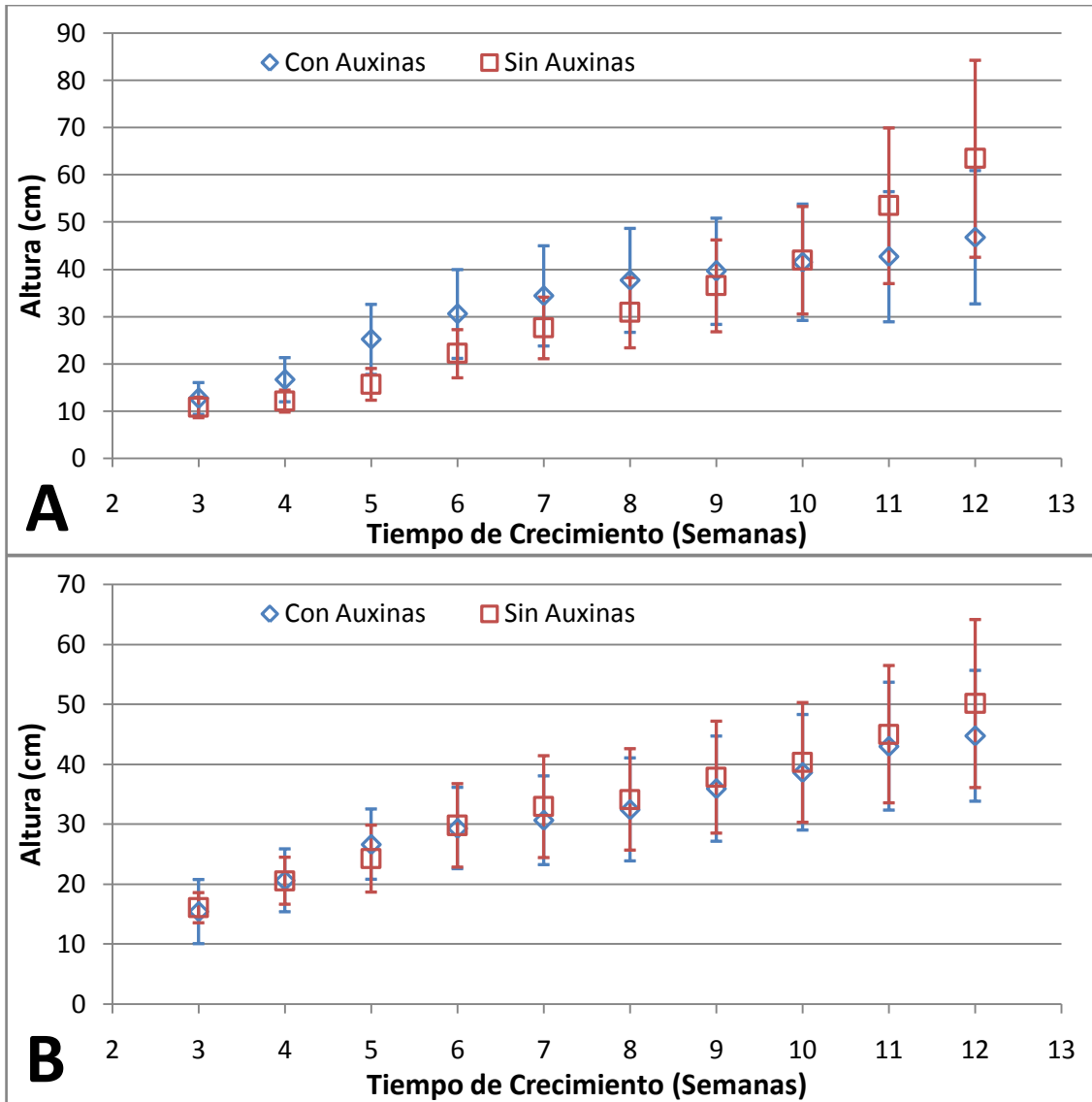


Figura 7.2. (Continuación). Respuesta en los parámetros de crecimiento frente a la aplicación de auxinas en *Bidens pilosa*. C) Altura de la planta cuando crece en suelos no contaminados con Pb (Control). D) Número de nudos de la planta cuando crece en suelos muy contaminados con Pb.

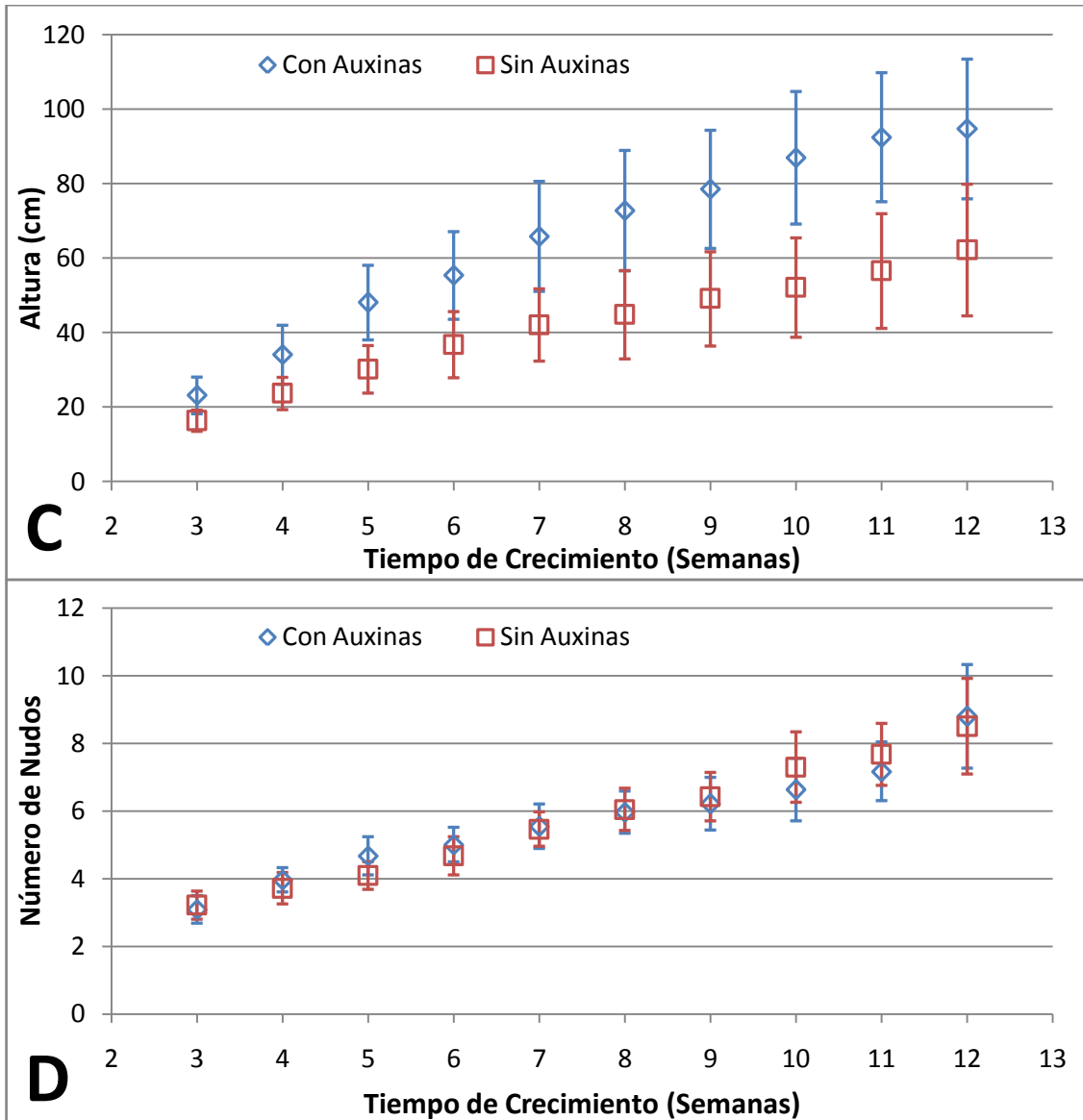


Figura 7.2. (Continuación). Respuesta en los parámetros de crecimiento frente a la aplicación de auxinas en *Bidens pilosa*. E) Número de nudos de la planta cuando crece en suelos medianamente contaminados con Pb. F) Número de nudos de la planta cuando crece en suelos Control.

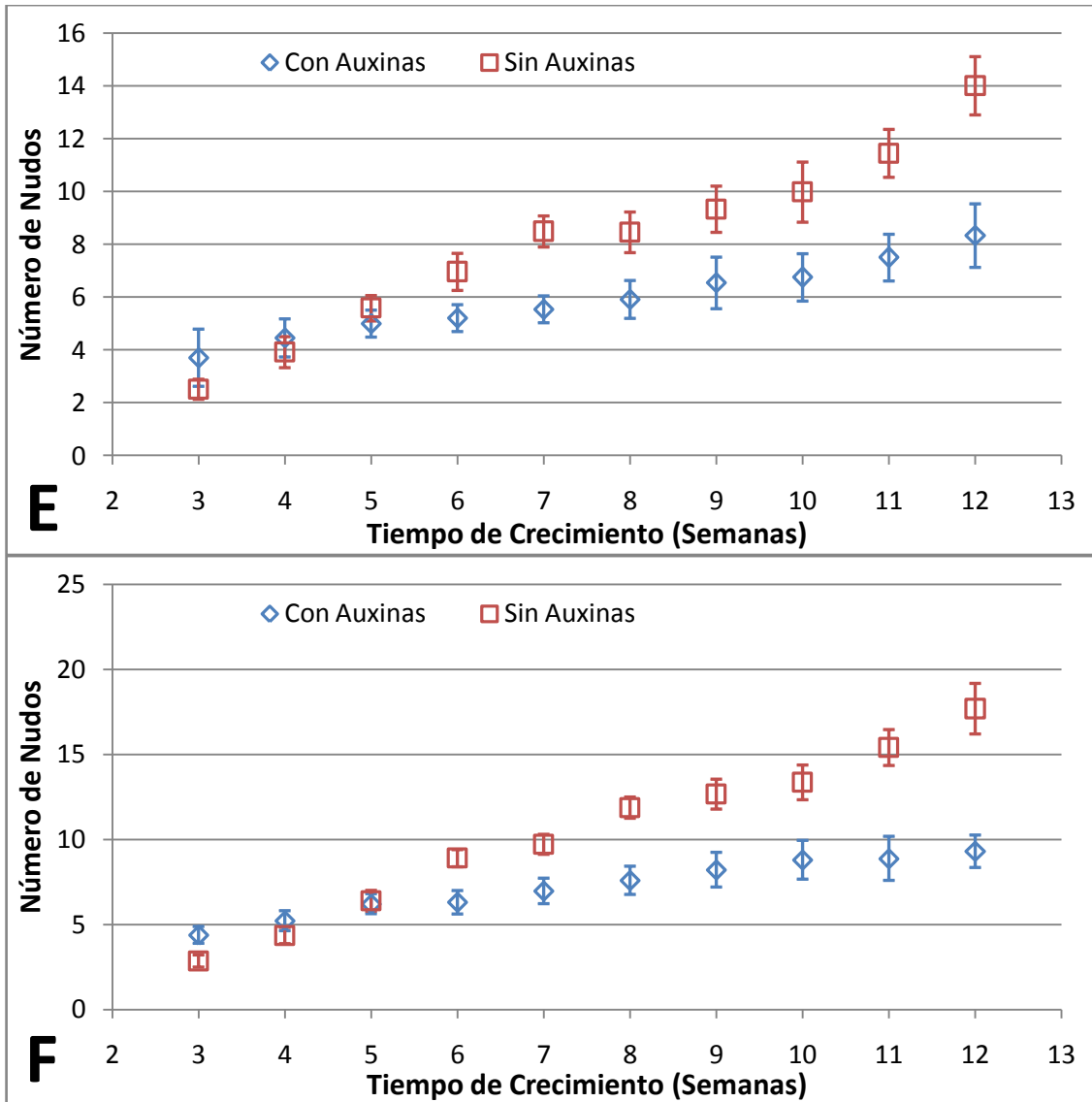


Tabla 7.2. Parámetros de crecimiento vegetal en *Bidens pilosa* medidos al finalizar el experimento con aplicación de Auxinas en suelos con diferentes niveles de Pb.

Tratamiento		Altura (cm) ± DS (p<0,001)		Número de nudos ± DS (p<0,001)	
Con Auxinas	Alta	32,76 ± 2,57	c	5,7 ± 0,2	c
	Media	31,7 ± 2,8	c	5,9 ± 0,1	c
	Control	65,12 ± 1,17	a	7,18 ± 0,11	a
Sin Auxinas	Alta	31,4 ± 1,2	c	5,7 ± 0,2	c
	Media	33,09 ± 1,07	c	5,75 ± 0,14	c
	Control	41,3 ± 1,4	b	6,1 ± 0,1	b

Letras diferentes indican diferencia significativa para altura y número de nudos entre los 6 tratamientos.

En la Tabla 7.3. se presentan los resultados de la producción de biomasa de los distintos órganos en ambas especies para los diferentes tratamientos. Para *T. minuta* se detectó interacción estadística entre los dos factores, en los tres órganos, observándose que la aplicación de auxinas estimuló el desarrollo de la biomasa en toda la planta, aunque únicamente cuando el suelo tuvo concentraciones bajas de Pb (Control).

Tabla 7.3. Resultados de la producción de biomasa en g PS por órgano y por planta en *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* como respuesta al uso de auxinas y concentraciones crecientes de Pb en suelos.

Especie	Tratamiento	Suelo	Biomasa en g PS		
			Hoja ***	Tallo ***	Raíz *
<i>Tagetes minuta</i>	Con Auxinas	Control	1,05±0,06 a	1,68±0,05 a	0,23±0,02 a
		Media	0,39±0,04 d	0,68±0,02 d	0,11±0,01 c
		Alta	0,38±0,07 d	0,51±0,10 d	0,07±0,01 d
	Sin Auxinas	Control	0,71±0,09 b	1,19±0,21 b	0,19±0,03 b
		Media	0,56±0,07 c	0,96±0,10 c	0,14±0,01 c
		Alta	0,44±0,08 d	0,58±0,09 d	0,08±0,01 d
			Hoja ns-**	Tallo **	Raíz ns-**
<i>Bidens pilosa</i>	Con Auxinas	Control	0,62±0,16 a	2,05±0,71 a	0,28±0,10 a
		Media	0,29±0,10 b	0,55±0,18 b	0,15±0,07 b
		Alta	0,28±0,17 b	0,59±0,37 b	0,14±0,09 b
	Sin Auxinas	Control	0,41±0,04 a	1,00±0,12 b	0,18±0,01 a
		Media	0,35±0,01 b	0,66±0,03 b	0,17±0,02 b
		Alta	0,24±0,02 b	0,49±0,09 b	0,09±0,01 b

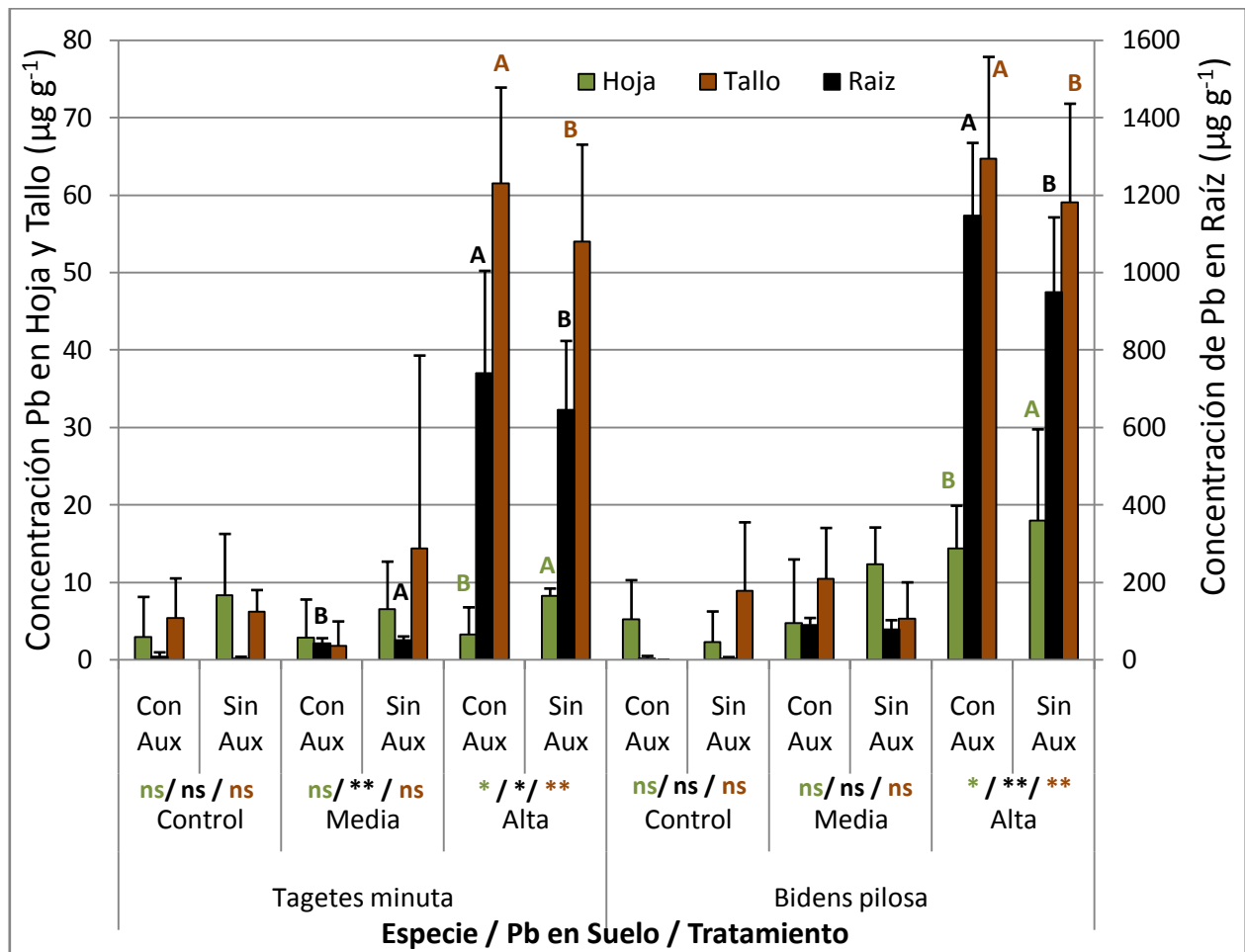
Niveles de significancia estadística: ns (no significativo); * (p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001). Letras diferentes indican diferencias significativas. Para la biomasa de tallo se detectó interacción estadística por lo cual realizó un único ANOVA. Para la biomasa de hoja y raíz la primera letra corresponde al ANOVA para el factor “uso de auxinas” y la segunda para el factor “Pb en suelo”.

Para *B. pilosa* los resultados (Tabla 7.3.) mostraron que las diferencias en la biomasa producida en hojas y raíces no fueron significativas cuando se comparó la aplicación, o no, de auxinas. Estas diferencias fueron significativas cuando se analizó este efecto sobre tallos en suelos Control, pero no se observó cuando las concentraciones de Pb en suelos fueron elevadas. Las diferencias en la biomasa seca producida por las plantas a niveles crecientes de Pb en suelo fueron significativas en los tres órganos de esta especie, observándose una reducción en la misma por efecto del Pb.

7.3.2. Concentración de Pb en plantas

En la Figura 7.3. se presentan los resultados para la concentración de Pb en los distintos órganos de ambas especies sometidas a los diferentes tratamientos. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) comparando los dos tratamientos de auxinas dentro de cada nivel de Pb en suelo y para cada especie, el mismo se expone en la Figura 7.3. Solo se encontraron diferencias significativas cuando las plantas crecieron en los suelos altamente contaminados. En ambas especies se observó el mismo patrón: la concentración de Pb en raíces y tallos se vio incrementada a causa de la aplicación de auxinas, mientras que la concentración de Pb en hoja se vio disminuida. También se realizaron ANOVAs comparando la concentración de Pb en los órganos entre las plantas que crecieron en suelos con diferentes niveles de Pb dentro de cada uno de los tratamientos de auxinas (Tabla 7.4.) encontrándose diferencias significativas en los tres órganos de las dos especies estudiadas, a concentraciones crecientes de Pb en suelo. Las plantas siempre acumularon más en el sitio altamente contaminado, aunque no se encontraron diferencias entre el suelo Control y el medianamente contaminado (Tabla 7.4).

Figura 7.3. Concentración de Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) en raíces, tallos y hojas de *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* cuando crecen en suelos con concentraciones crecientes de Pb y con aplicación de auxinas.



Niveles de significancia estadística: ns (no significativo); * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre la concentración de Pb en órganos de plantas que crecieron con o sin auxinas en suelos con diferentes niveles de Pb.

Tabla 7.4. Resultados de los análisis de la varianza (ANOVA) para la concentración de Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) en los órganos de *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* en respuesta al uso de auxinas y concentraciones crecientes de Pb en suelos.

Especie	Tratamiento	Suelo	Concentración de Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)		
			Hoja (ns)	Tallo (***)	Raiz (***)
<i>T. minuta</i>	Con Auxinas	Control	3,97 ± 5,14	5,41 ± 5,09 b	7,9 ± 7,6 c
		Media	2,85 ± 4,93	1,81 ± 2,01 b	43,2 ± 12,4 b
		Alta	3,29 ± 3,17	61,5 ± 12,4 a	741 ± 263 a
	Sin Auxinas	Control	8,35 ± 7,89	6,25 ± 2,74 b	3,89 ± 3,67 c
		Media	6,52 ± 6,14	14,4 ± 20,1 b	50 ± 9 b
		Alta	8,24 ± 0,94	54 ± 12 a	646 ± 177 a
			Hoja (**)	Tallo (***)	Raiz (**)
<i>B. pilosa</i>	Con Auxinas	Control	5,24 ± 3,37 b	0 ± 0 c	4,43 ± 3,27 c
		Media	5,74 ± 2,21 b	11 ± 6 b	91 ± 17 b
		Alta	15 ± 5 a	65 ± 13 a	1147 ± 188 a
	Sin Auxinas	Control	2,28 ± 1,95 c	8,95 ± 8,79 b	4,63 ± 2,17 c
		Media	13,4 ± 4,7 b	5,33 ± 4,66 b	80 ± 21 b
		Alta	18 ± 7 a	59 ± 13 a	950 ± 192 a

Niveles de significancia estadística: ns (no significativo); * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$). Letras diferentes indican diferencias significativas para el factor “Pb en suelo”.

7.3.3. Factor de translocación

En la Tabla 7.5. se presentan los resultados para los factores de translocación (FT R-A) calculados para de *T. minuta* y *B. pilosa* en los distintos experimentos. Para *T. minuta* se observó que el uso de auxinas redujo drásticamente el FT cuando esta especie creció en suelos Control. Los tratamientos ensayados no introdujeron cambios significativos en el FT para *B. pilosa*, aunque en el suelo Control se observó una tendencia similar a la descrita en *T. minuta*.

Tabla 7.5. Resultados de los factores de translocación desde la raíz a la parte aérea (FT R-A) de Pb y análisis de la varianza (ANOVA) en *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* como respuesta al uso de auxinas y concentraciones crecientes de Pb en suelos.

Especie	Suelo	Tratamiento	FT R-A (*)
<i>Tagetes minuta</i>	Control	Con Auxinas	0,12 ± 0,11 b
		Sin Auxinas	1,41 ± 0,78 a
	Media	Con Auxinas	0,05 ± 0,04 b
		Sin Auxinas	0,27 ± 0,36 b
	Alta	Con Auxinas	0,05 ± 0,03 b
		Sin Auxinas	0,06 ± 0,02 b
Especie	Suelo	Tratamiento	FT R-A (ns)
<i>Bidens pilosa</i>	Control	Con Auxinas	0,08 ± 0,07
		Sin Auxinas	0,66 ± 0,54
	Media	Con Auxinas	0,10 ± 0,06
		Sin Auxinas	0,10 ± 0,04
	Alta	Con Auxinas	0,04 ± 0,01
		Sin Auxinas	0,05 ± 0,01

Niveles de significancia estadística: ns (no significativo); * (p<0,05); ** (p<0,01); *** (p<0,001). Letras diferentes indican diferencias significativas. En *B. pilosa* ninguno de los dos factores introdujo diferencias significativas. En *T. minuta* se observó interacción por ello hay un único ANOVA.

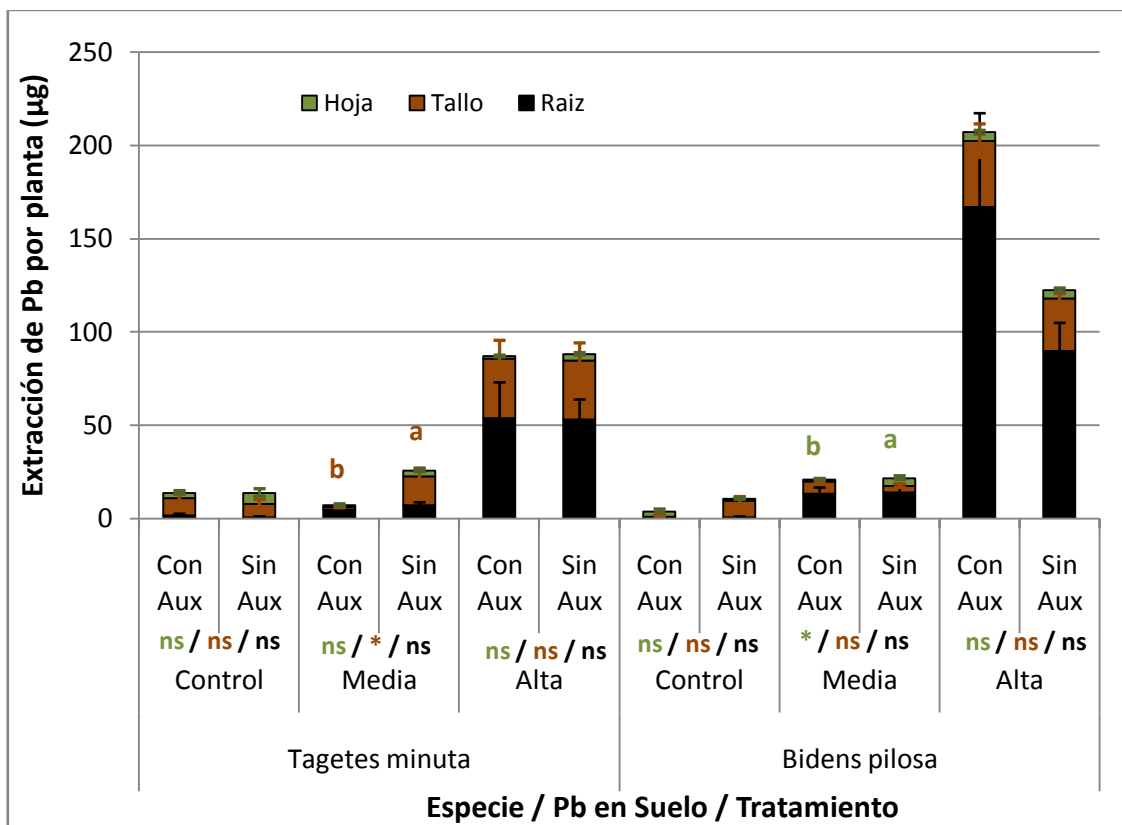
7.3.4. Extracción total de Pb por planta y por órgano

En la Figura 7.4. se grafican los resultados para la extracción de Pb por planta y por órgano, en *T. minuta* y *B. pilosa* en los tratamientos con auxinas y concentraciones crecientes de Pb en suelo. Para la primera especie, no se observaron diferencias significativas ni tendencias en la extracción de Pb por el uso de auxinas excepto en el caso del tallo cuando las plantas crecían en concentraciones medias de Pb en suelo. En dicho caso el uso de auxinas causó una disminución de la extracción neta. Para la segunda especie, las diferencias entre tratamientos fueron estadísticamente significativas solo para la extracción neta de Pb en hoja cuando las plantas crecieron en suelos con niveles medios de Pb. Pese a los grandes desvíos encontrados para esta especie en el resto de los tratamientos, puede observarse un importante incremento en la extracción de Pb por planta debido al uso de auxinas en suelo con elevada concentración de Pb, aumento que se concentró fundamentalmente en la raíz.

Los resultados encontrados para la extracción total por planta no confirmaron lo esperado para este experimento. La bibliografía indica que los casos en los que se logró que

una especie acumuladora aumente su tasa neta de extracción fueron aquellos en que se aplicaron auxinas. El mecanismo de acción estaría definido por un aumento en la biomasa y en las tasas de evapotranspiración, sin que esto reduzca la concentración de Pb en los tejidos vegetales (Du et al., 2011). En nuestro experimento, las hormonas no tuvieron ese efecto, no causaron un efecto en la biomasa y en algunos casos la redujeron, mientras que aumentaron la concentración de Pb en raíces y tallos únicamente cuando las plantas crecieron en suelos con elevado contenido de Pb. Como el elevado contenido de Pb en suelo redujo la biomasa de las plantas de este tratamiento, el incremento en concentración causado por las auxinas no pudo traducirse en un incremento de la extracción neta por planta. Existe la posibilidad de que el Pb contenido en el suelo este interactuando con las auxinas y se vuelvan mutuamente poco biodisponible, esta hipótesis justificaría por qué las auxinas no producen su efecto típico cuando las plantas crecen en suelos con concentraciones de Pb creciente y por qué la translocación y extracción de Pb se ven reducidas debido al uso de estas fitohormonas. En relación a esto pueden destacarse los resultados obtenidos por Kuffner et al. (2008), quienes estudiaron la liberación de exudados producidos por microorganismos rizosféricos y su relación con la disponibilidad de metales pesados en suelo. En dicho estudio se encontraron tres especies de bacterias que producen IAA, la misma fitohormona utilizada en el experimento reportado en este capítulo. En los tres casos la disponibilidad de metales pesados se vio disminuida con respecto al control. Hecho que es consistente con lo propuesto aquí como hipótesis.

Figura 7.4. Extracción total de Pb (μg) por planta y órgano en las especies *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* en el tratamiento con auxinas y concentraciones crecientes de Pb en suelo.



Letras diferentes indican diferencias significativas entre la extracción total de Pb por órgano y por planta debido al uso o no de auxinas dentro de cada nivel de Pb en suelo. ns: no significativo, $p < 0,05$ (*).

7.3.5. Capacidad extractora de Pb de los exudados radicales de *T. minuta* y *B. pilosa*

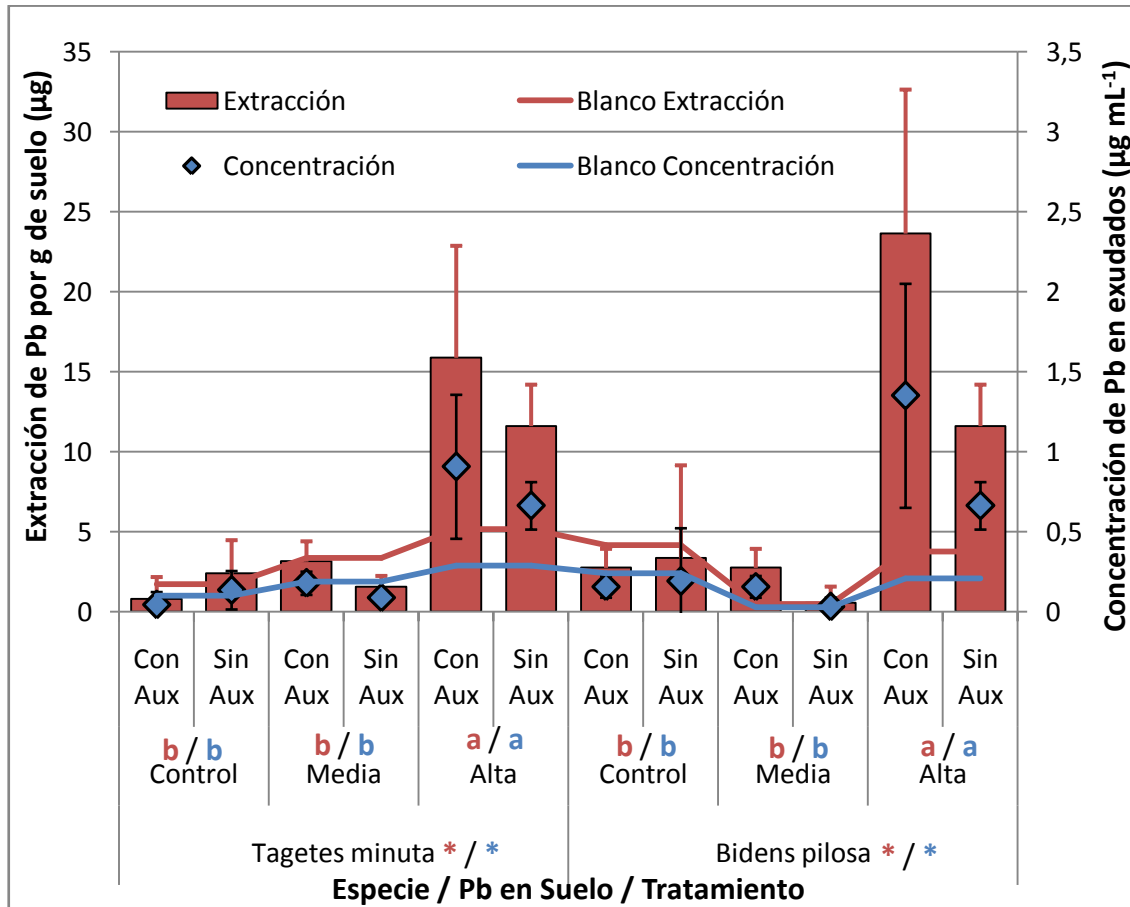
Para el estudio de los exudados de *T. minuta* y *B. pilosa*, se calcularon dos variables que indican la capacidad extractiva de los mismos. Una es la concentración del metal en la solución, es decir en el medio de extracción de los exudados, y otra es la cantidad de metal extraída de cada gramo de suelo cuando se agregan exudados al mismo, es decir la cantidad de Pb que puede ser extraída del suelo mediante los exudados. En la Figura 7.5. se muestran los resultados para estas dos variables en ambas especies estudiadas. Los resultados expuestos corresponden al ensayo en que se utilizaron exudados de plantas que habían crecido en el suelo que presentaba la misma concentración de Pb que el suelo en que se realizó la extracción. Tanto la concentración en el extracto de exudados como la

extracción neta de Pb a partir del suelo, se vieron significativamente afectadas sólo por la concentración de Pb en suelo, aunque esta diferencia únicamente se observó en el suelo con la mayor concentración del metal. En los suelos Control y Media, los exudados no extrajeron mayor cantidad de Pb que cuando fueron tratados con agua MilliQ (Blanco). Esto podría indicar que ante concentraciones moderadas o bajas de Pb en suelo, los exudados no aumentan la disponibilidad del metal, ya que la cantidad extraída en los tratamientos Control y Media fue la misma.

Si bien el uso de auxinas no introdujo diferencias estadísticamente significativas en la capacidad extractiva de los exudados, tanto en los resultados encontrados para *T. minuta* como para *B. pilosa*, puede observarse una tendencia de aumento en la extracción cuando se utilizan auxinas en los suelos muy contaminados. También es destacable que, en este caso, el uso de auxinas introdujo una varianza muy grande, mostrando que la capacidad de responder al uso de dichas hormonas cuando las plantas crecen en suelos contaminados es muy variable entre los diferentes individuos.

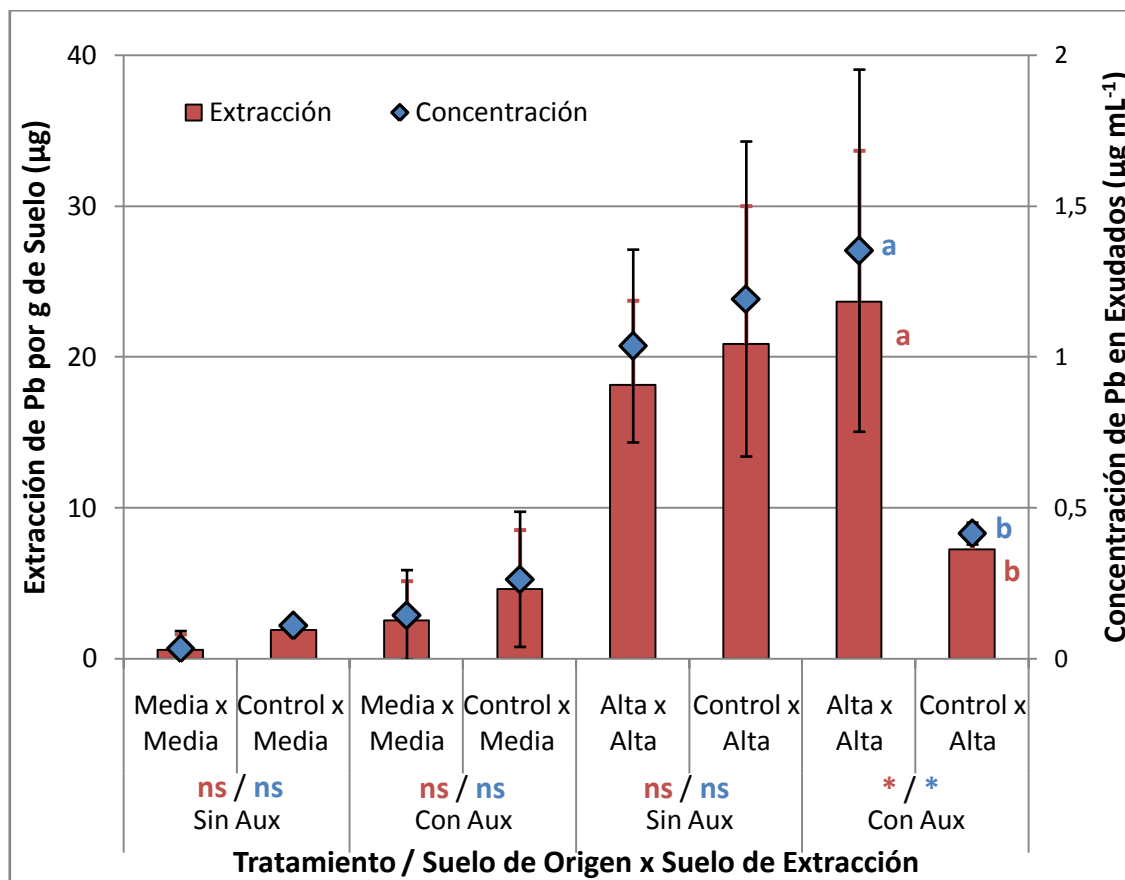
Con la finalidad de analizar el efecto de las condiciones de cultivo sobre la capacidad extractora de los exudados rizosféricos se utilizaron los exudados de plantas de *B. pilosa* cultivadas en suelo Control para extraer Pb de suelos contaminados. Los resultados se muestran en la Figura 7.6. Los exudados de las plantas extrajeron una mayor cantidad de Pb de los suelos altamente contaminados, independientemente de su origen mientras no fueron tratados con auxinas. Cuando se les aplicó esta hormona, los exudados de las plantas desarrolladas en suelos Control perdieron la capacidad extractiva, mientras que las plantas desarrolladas en suelos muy contaminados y con aplicación de auxinas presentaron una capacidad extractiva mayor que aquellas que crecieron en el mismo suelo pero sin la fitohormona, no obstante esto es sólo una tendencia puesto que las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La falta de significancia puede atribuirse a la gran variabilidad de respuesta de los individuos frente al uso de las auxinas, efecto que también se observó en el análisis anterior.

Figura 7.5. Concentración de Pb en los exudados radicales de *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa*, y cantidad de Pb (μg) extraída de 1 g de suelo.



Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$. No hubo interacción entre los factores. El uso de auxinas no introdujo diferencias significativas, el contenido de Pb en suelo sí lo hizo. El color de las letras indica la variable comparada.

Figura 7.6. Capacidad extractiva de los exudados de *Bidens pilosa* en función de la concentración de Pb en el suelo en el que se desarrollaron y la aplicación de auxinas.



Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$ (*), ns: no significativo. El color de las letras indica la variable comparada.

Para relacionar la concentración de Pb en los diferentes órganos y la extracción por planta en órganos vegetales, con la capacidad extractiva de los exudados, se realizaron regresiones lineales simples, cuyos resultados se presentan en la Tabla 7.6. Pese a encontrarse coeficientes de regresión (R^2) estadísticamente significativos en casi todos los casos, los valores de los mismos no fueron muy elevados. En el caso de *T. minuta*, la capacidad extractiva de los exudados tuvo mayor influencia sobre las concentraciones de Pb (principalmente en la raíz) que sobre la extracción por planta. Para *B. pilosa*, resultó lo opuesto, encontrándose altos coeficientes de regresión entre la capacidad extractiva de los exudados y la extracción de Pb por planta en raíz y tallo. En todos los casos y para ambas especies, los coeficientes de cada modelo fueron positivos, indicando que el aumento en la capacidad extractiva de los exudados se traduce en una mayor incorporación de Pb en las

plantas. Esto indica que los exudados rizosféricos juegan un importante papel en la acumulación de Pb por las especies estudiadas, resultado que reviste importancia ya que en diversas especies acumuladoras de metales pesados se demostró que los exudados no participan de dicho proceso (Zhao et al., 2001) y en otras especies se demostró lo contrario (Niu et al., 2011). Los resultados encontrados en este capítulo muestran que este es un aspecto fundamental a ser estudiado en las especies que se pretenden utilizar como fitorremediadoras de suelos contaminados con Pb.

Tabla 7.6. Resultados de las regresiones lineales simples tomando como variables dependientes a las concentraciones de Pb en cada órgano y a las extracciones netas de Pb en cada órgano; y como variable regresora a la capacidad extractiva de los exudados expresada como concentración de Pb en los exudados.

Especie	Variable	Constante del modelo	Coefficiente del modelo	R ²	p
<i>Tagetes minuta</i>	Pb Hoja	5,62	6,8	0,2	0,0379
	Pb Tallo	12,22	37,76	0,32	0,0085
	Pb Raíz	44,3	827	0,63	0,0001
	Extracción Hoja			0,02	0,56
	Extracción Tallo	8,42	22,34	0,34	0,0069
	Extracción Raíz	8,91	33,72	0,3	0,01
<i>Bidens pilosa</i>	Pb Hoja			0,16	0,1
	Pb Tallo	14,38	21,38	0,28	0,0141
	Pb Raíz	142,7	486,75	0,5	0,0006
	Extracción Hoja	2,04	1,91	0,24	0,0238
	Extracción Tallo	5,32	17,37	0,74	< 0,0001
	Extracción Raíz	1,46	95,17	0,84	< 0,0001

7.4. Conclusiones

Las especies estudiadas fueron receptivas a la aplicación de auxinas, habiéndose encontrado que las mismas presentaron los efectos esperados cuando crecieron en los suelos Control. No obstante, el efecto tóxico del Pb presente en suelos no pudo ser compensado con este tratamiento. Se encontraron tasas de extracción neta que, en general, no fueron modificadas por el uso de auxinas, aunque *B. pilosa* mostró una extracción mayor cuando creció en suelos altamente contaminados y se aplicaron estas fitohormonas (incremento localizado fundamentalmente en la raíz).

Tagetes minuta y *Bidens pilosa* produjeron exudados capaces de extraer Pb de los suelos altamente contaminados; para la segunda especie se demostró que esto es independiente del tipo de suelo en el que se habían desarrollado las plantas. Pese a que el uso de auxinas no modificó la extracción de Pb por parte de estas especies, fue evidente que su uso afecta la producción de exudados de las mismas. Este efecto no es homogéneo en todos los individuos, presentando gran variabilidad de respuesta. Por otro lado también se encontró que los exudados producidos por plantas no tratadas con auxinas, que crecen tanto en suelos contaminados como no contaminados con Pb, tienen capacidad extractiva del metal; pero cuando crecen en suelos no contaminados el uso de auxinas reduce fuertemente esa capacidad.

8. Capítulo VIII.

Variables del suelo que determinan la acumulación de Pb en *Bidens pilosa* L. y *Tagetes minuta* L. cuando crecen en suelos contaminados. Interacción entre Pb, Zn y Cu en el sistema planta-suelo.

Resumen

La fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados ha sido propuesta por numerosos autores como una alternativa de remediación sustentable, que contempla la recuperación de suelos permitiendo que éstos mantengan su funcionalidad. Sin embargo, esta tecnología si bien muestra resultados óptimos para muchos metales, no ha sido efectiva para el plomo, uno de los contaminantes que presenta elevada fitotoxicidad. En los capítulos anteriores se estudiaron las variables que determinan la capacidad de extracción de metales pesados por plantas en condiciones controladas y los resultados no permitieron detectar factores que aumenten la eficiencia de extracción en *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa*, especies seleccionadas en esta tesis por su comportamiento como buenas acumuladoras del metal en trabajos de campo. En este capítulo, el objetivo fue evaluar a campo factores que podrían ser determinantes en la absorción de Pb por estas especies. Para ello se recolectaron suelos superficiales y plantas de *T. minuta* y *B. pilosa* en los mismos sitios, próximos a una antigua fundición de plomo en la localidad de Bouwer, Córdoba, Argentina. En muestras de suelos se realizaron extracciones secuenciales de metales pesados, se determinó el contenido de materia orgánica, la conductividad eléctrica, el pH, el tamaño del grano y el poder de aglomeración de la materia orgánica en estos suelos, separando el suelo *bulk* del rizosférico. Además, se estudió la diversidad bacteriana de la rizosfera de ambas especies por la técnica de DGGE. Las concentraciones de Pb, Cu y Zn en suelos y plantas (hojas, tallo y raíz) se cuantificaron por TXRF con radiación Sincrotrón, en el LNLS, Brasil. Los resultados muestran que la absorción de Pb por las plantas en suelos contaminados y su translocación a tejidos aéreos en las dos especies de Asteraceae estudiadas se relacionaron no sólo con los parámetros que tradicionalmente se miden en el suelo, sino también con el contenido de Zn y Cu en plantas y suelos, factores estos que tuvieron mayor relevancia.

8.1. Introducción

Los resultados encontrados en la investigación observacional a campo (Salazar y Pignata, 2014) llevada a cabo al inicio de esta tesis, donde se realizó el estudio de las especies nativas que crecían en una zona con suelos altamente contaminados con Pb,

permitió detectar aquellas que por su tolerancia al metal como por su capacidad acumuladora del mismo, podrían ser empleadas en la fitorremediación de suelos contaminados con este metal. Así, se seleccionaron dos especies: *Tagetes minuta* L. y *Bidens pilosa* L. las que acumulaban elevados niveles de Pb en sus hojas ($380,5 \mu\text{g g}^{-1}$ PS y $100,6 \mu\text{g g}^{-1}$ PS, respectivamente). Con estas especies se realizaron experimentos tendientes a conocer los factores que podían incrementar la absorción y translocación de plomo (Capítulos III a VII), detectándose tendencias muy importantes para algunos de ellos, al mismo tiempo que una gran variabilidad en la respuesta individual dentro de cada especie, hecho que dificultó el análisis estadístico en diseños experimentales con niveles de factores.

De acuerdo con estos antecedentes, en esta última etapa se retomaron los hallazgos observados en el Capítulo II, donde los resultados mostraban una variabilidad importante en la acumulación de otros metales sin que este resultado se relacionara claramente con el contenido de Pb en suelo, o al menos, con el correspondiente a la fracción pseudototal del metal, fracción de referencia que establecen las normas de fijación de estándares para determinar los límites máximos permitidos según los usos del suelo tanto en la legislación nacional como internacional (EPA, FAO, WHO; Argentina, 1993)

Un aspecto en el cual no habíamos profundizado en esta tesis, es la forma química en la que estaban presentes en suelo los metales estudiados (Pb, Cu y Zn). En este contexto, los resultados experimentales en invernadero, indicaron diferencias en la incorporación de éstos a las plantas según estuvieran como sales solubles mediante el enriquecimiento del metal específico en el laboratorio, o fueran parte preexistente de la matriz del suelo en experimentos realizados con suelos provenientes del área de estudio, los que presentaban un gradiente en la concentración de Pb. Si bien se habían analizado dos de las fracciones en las que estaba presente el Pb: extraíble con HCl 0,5 M, y pseudototal (Capítulos I y II), los resultados no permitieron encontrar una clara relación entre las concentraciones de Pb en el suelo y las concentraciones de Pb en las plantas. Por otro lado, es ampliamente conocido que tanto la movilidad de los metales pesados en suelos como su toxicidad sobre plantas dependen fundamentalmente de la forma química en que éstos se encuentran (especiación), así como de las asociaciones débiles o fuertes con los ligandos a los que están unidos (Gleyzes et al., 2002; Sutherland et al., 2000). Una técnica ampliamente utilizada que

permite obtener este tipo de información es la realización de extracciones secuenciales mediante el uso de sustancias o mezclas químicas selectivas (Cancès et al., 2008; Pickering, 1986). Esta metodología se basa en el empleo de diferentes medios de extracción de manera secuencial (de débiles a fuertes), los que presentan selectividad para disolver y extraer diferentes fracciones minerales a las que está asociado el metal. Estos métodos pretenden simular, con algunas modificaciones, las condiciones ambientales que podrían originarse mediante procesos naturales o antrópicos y que como resultado movilizarían metales en el suelo (Raksasataya et al., 1996).

Por lo expuesto anteriormente, en este capítulo se planteó como hipótesis que en el área de estudio (inmediaciones de la exfundición de Bowuer) existen gradientes para alguna de las variables (físicas, químicas, biológicas) de los suelos, las que podrían explicar los resultados obtenidos en los capítulos previos de esta tesis, así como permitir detectar factores que no se tuvieron en cuenta durante los primeros estudios a campo. De esta manera, en esta instancia se incluyó en el análisis de suelos provenientes de los muestreos realizados a campo, la determinación de la concentración de Pb, Zn y Cu mediante extracción secuencial en suelos *bulk* y rizosféricos de las dos especies (*T. minuta* y *B. pilosa*). Así, la extracción secuencial de estos metales se hizo con la finalidad de determinar la concentración de los mismos en las distintas fracciones de suelo *bulk* y rizosférico ya que representan las formas químicas asociadas a distintos ligandos en el suelo, siendo las que determinan su movilidad y biodisponibilidad (Tessier et al., 1979).

Por otra parte, se decidió realizar un análisis de diversidad microbiológica tanto en suelo *bulk* como rizosférico para ambas especies y en cada uno de los sitios de muestreo, ya que existe abundante evidencia bibliográfica que señala la contaminación de los suelos con metales pesados como una de las causas que modifican la diversidad de comunidades de microorganismos en suelos, lo que posiblemente a nivel de rizosfera distinga a las especies tolerantes y acumuladoras de las que no lo son. Así, a menudo se encuentran en la rizosfera bacterias y hongos resistentes y acumuladores de determinados metales (Kidd et al., 2009). Estos microorganismos pueden actuar estimulando el crecimiento de la raíz, con lo cual habría una mayor superficie de interacción raíz-suelo que facilitaría la extracción de nutrientes y entre ellos el contaminante (Abou-Shanab et al., 2003). Este fenómeno potenciaría la producción de biomasa con lo cual aumentaría la extracción neta total del

metal (Dell'Amico et al., 2008). Otro modo de acción de los microorganismos en el suelo es a través de la formación de compuestos solubles del metal, o también mediante la transformación de estos en formas menos tóxicas (Dimpka et al., 2008).

8.2. Materiales y métodos

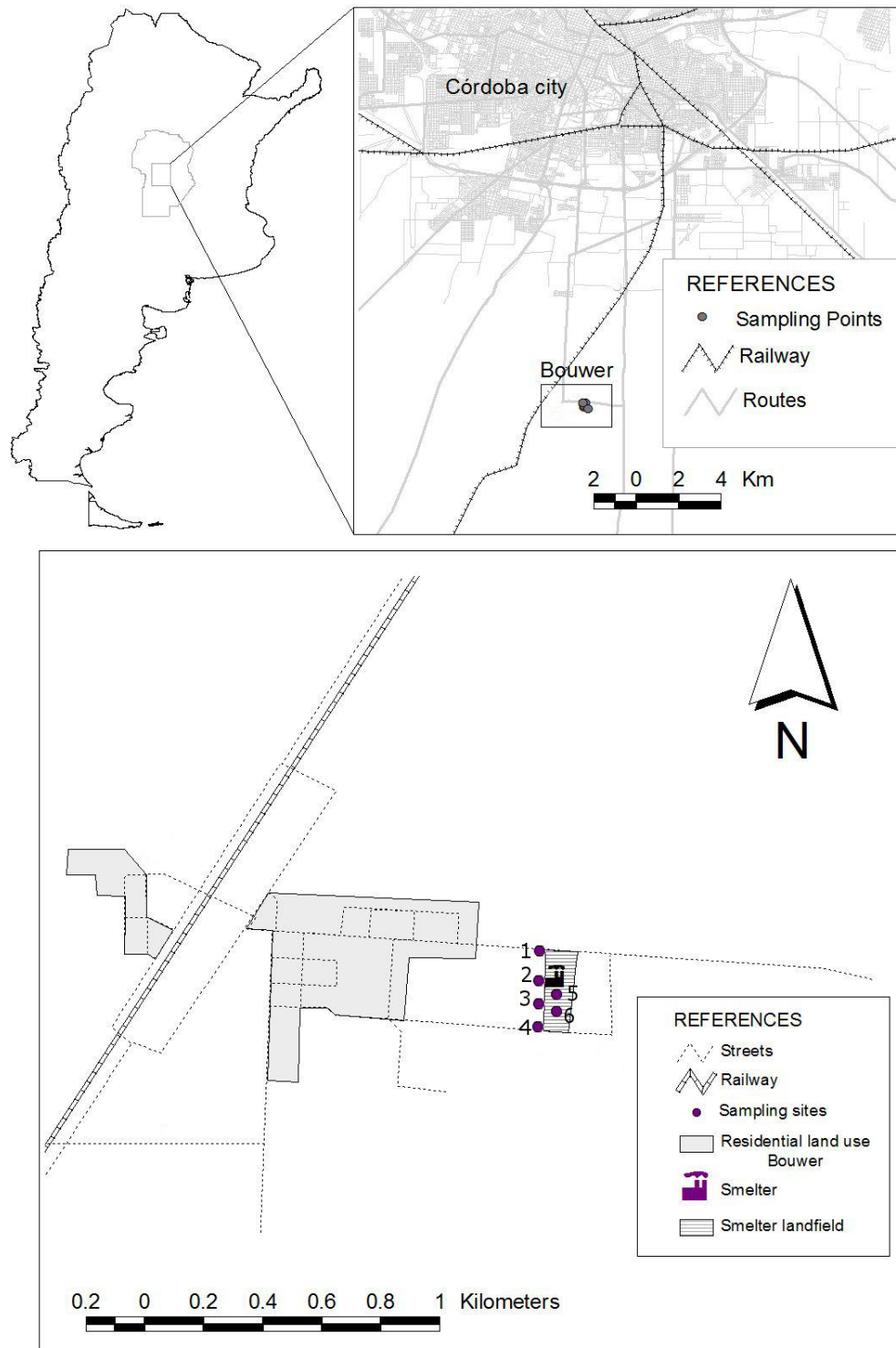
8.2.1. Área de estudio

El área de estudio seleccionada para esta etapa, fue nuevamente la localidad de Bouwer, descrita en el Capítulo I. En base a los resultados reportados en los Capítulos I y II se escogieron seis sitios de muestreo (Figura 8.1.) con el fin de contemplar un gradiente de concentración de Pb en los suelos y asegurar la presencia de las dos especies de interés, *Tagetes minuta* L. y *Bidens pilosa* L.

8.2.2. Procedimiento de muestreo

Las muestras vegetales y de suelos superficiales fueron recolectadas siguiendo un diseño sistemático, para lo cual cada sitio consistió en un cuadrado de 9 m². En cada uno se recogieron tres muestras, compuesta cada una de ellas por tres individuos de cada especie para lo cual se utilizó una pala de acero inoxidable y se colectaron las plantas completas con la raíz, incluyendo el suelo rizosférico. Para obtener cada muestra compuesta se seleccionaron tres ejemplares que crecían a una distancia no mayor a 10 cm entre ellos. El tallo de cada planta fue cortado en la base para separar la parte aérea (que se guardó en bolsas de papel) de la rizosfera (que se guardó en bolsas de plástico estériles). En cada sitio de muestreo también se recogieron tres muestras compuestas de suelo *bulk* superficial usando un barreno para muestras compuestas de 15 cm de profundidad, y éstas se guardaron en bolsas estériles. Todas las herramientas de trabajo y las manos del operador se limpiaron con agua y alcohol etílico al 70% entre cada muestreo.

Figura 8.1. Ubicación de los sitios de muestreo de *T. minuta* y *B. pilosa*, y de suelos *bulk* y rizosféricos en los que se analizaron Pb, Zn y Cu a partir de extracción secuencial, en la localidad de Bouwer, provincia de Córdoba, Argentina.



Una vez en el laboratorio las bolsas estériles con muestras de suelo (*bulk* y rizosfera) fueron abiertas en condiciones estériles separando 1 g de suelo fresco por duplicado para cada muestra, con el objetivo de realizar en ellas un análisis DGGE a fin de estudiar la diversidad de la comunidad de microorganismos bacterianos del suelo. Estas muestras se guardaron en tubos Eppendorf a -80 ° C hasta su análisis.

Las raíces fueron separadas del suelo rizosférico por agitación en cajas de plástico y posterior tamizado. Las raíces, así como también los tallos y las hojas, se lavaron con agua regular primero, luego fueron sonicadas y lavadas tres veces con agua milli-Q. Posteriormente se las llevó a estufa a 40 ° C hasta que alcanzaron peso seco (PS) constante. Se determinó la biomasa seca producida por planta y por órgano y luego las muestras fueron trituradas con un molinillo de acero inoxidable y conservadas en bolsas plásticas herméticas hasta su posterior análisis.

Las muestras de suelos *bulk* y rizosféricos se secaron en estufa a 40 °C durante 24 h. Todas las muestras se tamizaron a 2 mm (utilizando un tamiz de polietileno) y se almacenaron en oscuridad hasta que se llevaron a cabo los procedimientos analíticos (Bäckström et al., 2004).

8.2.3. Análisis fisicoquímicos y microbiológicos

8.2.3.1. Conductividad eléctrica, pH, porcentaje de materia orgánica y tamaño de grano en suelos superficiales

El pH y la conductividad eléctrica (CE) de los suelos superficiales se midieron en una suspensión 1:5 suelo:agua por triplicado (Bäckström et al., 2004). Con el fin de trabajar con peso seco (PS), las muestras se secaron en estufa a 105 °C hasta peso constante (Al-Khashman y Shawabkeh, 2006). El porcentaje de materia orgánica (OM%) se determinó según Gallardo et al. (1987) mediante combustión de las muestras a 700 °C durante dos horas, esta temperatura se alcanzó con una rampa de ascenso controlado en una mufla modelo Programador Full (INDEF, Argentina) a 5 °C por minuto.

El tamaño de grano se midió por láser de difracción de acuerdo con la metodología descrita por Gaiero et al. (2013) utilizando un analizador Horiba LA-950 después de la eliminación de la materia orgánica, mediante tratamiento de los suelos con H₂O₂ grado

analítico al 30% V/V. La precisión (reproducibilidad) de la determinación por difracción láser se puso a prueba mediante el uso de mezclas de cuentas de vidrio (NIST Traceable polydisperse particle standard PS202/3-30 μm and PS215/10-100 μm , Whitehouse ScientificW). Para ambas mediciones en el equipo (Ps202, n=6 y PS215, n=5) la mediana (D50) fue menor al 3% del valor nominal certificado, y los percentiles D10 y D90 estuvieron dentro del 5% de los valores nominales. Está documentado que la adsorción de los metales pesados a partículas de diferentes tamaños regula su disponibilidad (Madrid et al., 2008; Qian et al., 1996); no obstante, el efecto físico de la materia orgánica sobre la agregación de las partículas y sus efectos sobre la disponibilidad de metales pesados en suelos, no está suficientemente estudiado. A fin de evaluar el efecto de la agregación de la materia orgánica sobre el tamaño de grano en el suelo rizosférico de *Tagetes minuta* se midió el tamaño de grano dos veces, una eliminando previamente la materia orgánica y la segunda sin haber eliminado la materia orgánica.

8.2.3.2. Metales pesados en suelos superficiales

Con el objetivo de analizar las diferentes fracciones en que se encuentran los metales pesados en el suelo (*bulk* y rizosférico de ambas especies), se realizó una extracción secuencial de éstos según lo descrito por Tessier et al. (1979) después de tamizar las muestras a 64 μm . Las fracciones estudiadas fueron:

Fracción 1 "intercambiable": Incluye los metales pesados adsorbidos al suelo. El procedimiento de extracción se basa en el hecho de que ligeros cambios en la composición iónica del agua pueden afectar a los procesos de adsorción-desorción. Para la extracción de esta fracción, 1 g de suelo fue tratado a temperatura ambiente durante 1 h con 8 mL de solución de cloruro de magnesio (1 M MgCl_2 , pH 7,0) con agitación continua. El sobrenadante se recogió y se filtró a 2 μm después de haber sido separado por centrifugación (30 minutos a 3000 rpm). El residuo sólido se lavó con 10 ml de agua Milli-Q con agitación durante 30 minutos, después de la centrifugación y el descarte del agua de lavado, el residuo se conservó para la extracción de la siguiente fracción. Estos pasos de filtrado y lavado se repitieron después de cada paso de extracción.

Fracción 2 "Unida a Carbonatos": Incluye los metales pesados asociados a los carbonatos del suelo; esta fracción es susceptible a los cambios de pH. Para realizar la

extracción, el residuo de la fracción 1 se trató a temperatura ambiente con 8 mL de acetato de sodio (NaCH_3COO) 1 M con pH ajustado a 5,0 con ácido acético (CH_3COOH) con agitación continua.

Fracción 3 "Unida a Óxidos de Hierro y Manganeso": los óxidos de hierro y manganeso están presentes en el suelo como material ligante entre las partículas, o simplemente como un revestimiento de las mismas; estos óxidos son excelentes secuestradores de metales traza y son termodinámicamente inestables bajo condiciones anóxicas. Para la extracción de esta fracción, el residuo de la extracción anterior se trató con 20 mL de cloruro de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) 0,04M en CH_3COOH 25% V/V a 96 °C durante 6 horas con agitación periódica.

Fracción 4 "Unida a Materia Orgánica": los metales traza se pueden unir a las diversas formas de la materia orgánica presente en suelos. Bajo condiciones oxidantes, la materia orgánica puede ser degradada, por lo que para la extracción de esta fracción, al residuo de la fracción 3 se añadieron 3 mL de HNO_3 0,02 M y 5 mL de H_2O_2 al 30% con pH ajustado a 2. La mezcla se llevó a 85 °C durante 3 horas con agitación periódica. Después de enfriada, se le añadieron 5 mL de acetato de amonio ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$) 3,2 M en 20% (V/V) de HNO_3 . La muestra se diluyó con agua milli-Q hasta llegar a 20 mL y se agitó continuamente durante 30 min.

Fracción 5 "Residual": Una vez que se extrajeron las primeras cuatro fracciones, el sólido residual, compuesto por minerales primarios y secundarios, contiene metales pesados dentro de su estructura cristalina. La extracción de esta fracción se realizó de acuerdo con Ketterer et al. (2001) utilizando el residuo de la fracción 4 al que se adicionaron 10 mL de HNO_3 puro. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se dejó reposar durante 24 horas. Finalmente se lo llevó a un volumen final de 25 mL utilizando agua milli-Q.

Las cinco extracciones filtradas (filtro de papel Munktell, Alemania, poro de 2 μm) se utilizaron para el análisis multi-elemental por Fluorescencia de Rayos X- Reflexión Total (TXRF) usando radiación sincrotrón como se describió en el Capítulo V. El mismo método se empleó en este capítulo para plantas. La suma de las cinco fracciones constituye lo que a continuación se denominará fracción pseudototal.

8.2.3.3. Diversidad bacteriana de los suelos

El análisis de diversidad bacteriana fue llevado a cabo en los laboratorios del Centro de Investigaciones en Fermentaciones Industriales, CCT-La Plata CONICET, en la Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

El ADN total fue extraído a partir de 1 g de suelo usando el kit Omega Bio-Tek EZNA para ADN de suelos. El extracto de ADN se almacenó a -20 °C. Luego se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el kit de reactivos ADN polimerasa GoTaq (Promega-E.E.U.U.). La amplificación por PCR del gen 16S rDNA se llevó a cabo utilizando los primers universales de bacteria 341F-GC: (5'-CGC CCG CCG CGC CCC CCC GTC GCG CCG CCG CCG CCC CCC T CCT ACG GGA AGC GGC AG-3'; T_m = 92,8) y 907R: (5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3'; T_m = 55,3). El fragmento amplificado de ARNr 16S se utilizó para el análisis por DGGE según Demergasso et al. (2005).

El programa de termociclado utilizado para la amplificación fue:

Paso 1: 1 ciclo de 4 minutos a 96 °C.

Paso 2: a) 10 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 62 °C y 1 minuto a 72 °C; b) 25 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 57 °C y 1 minuto a 72 °C.

Paso 3: 1 ciclo de 10 minutos a 72 °C.

El producto de la PCR fue corrido a 60 °C y 100V durante 16 h en un gradiente desnaturizante de entre el 30 y 70%, donde el 100% de desnaturización se define como urea 7 M y 40% (v / v) de formamida (Muyzer et al., 1993). Los geles se tiñeron con SYBR-Gold para luego ser visualizados en un transiluminador UV y fotografiados. Finalmente, se los analizó utilizando el software ImageTool.

8.2.3.4. Concentración de metales pesados en las plantas

Las concentraciones de metales pesados en los tejidos de las plantas se determinaron de acuerdo a Wannaz et al. (2011), para lo cual, se tomó 1 g PS de las muestras secas trituradas de raíces, tallos y hojas de *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* provenientes de cada sitio de muestreo para su análisis por Fluorescencia de Rayos X-Reflexión Total (TXRF)

usando radiación sincrotrón. El material vegetal fue reducido a cenizas en mufla a 450 °C por 4 h, las cenizas fueron digeridas con 3 mL de HNO₃ calidad analítica a 25 ± 2 °C. El residuo sólido se separó por centrifugación, y se ajustó el volumen del sobrenadante a 5 mL con agua Milli-Q. Después, se añadieron 10 ppm de una solución de Ga como patrón interno. Se tomaron alícuotas de 5 µL de esta solución y se las secó sobre un soporte de acrílico. Se prepararon soluciones estándar con concentraciones conocidas de Cu⁺², Pb⁺² y Zn⁺² (también con Ga como patrón interno) para la calibración del sistema. Las muestras fueron medidas 200 s, utilizando la configuración de reflexión total montada en la línea de luz de fluorescencia de rayos X del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS), Campinas, SP, Brasil. Para ello, un haz policromático de aproximadamente 5 mm de ancho y 0,1 mm de altura se utilizó para la excitación. Para la detección de rayos X, se utilizó un detector de Si (Li) con una resolución de energía de 165 eV a 5,9 keV.

Como control de calidad se prepararon blancos y material certificado estándar de hojas de tabaco Oriental (CTA-OTL-1, ICTJ) y de ryegrás CRM 281 (Comisión Europea / BCR) de la misma manera que el resto de las muestras. Los porcentajes de recuperación para los materiales certificados vegetales fueron de 86 ± 7% para Pb, 81 ± 3 % para Cu, 84 ± 3 % para Co, 86 ± 5 % para Ni, 86 ± 8 % para Fe, 85 ± 2 % para Zn, y 84 ± 3 % para Mn, estos son porcentajes promedio y sus desvíos estándar expresados con respecto al valor declarado y teniendo en cuenta todas las determinaciones realizadas por TXRF en dichos materiales a lo largo de la tesis completa. Se calculó el coeficiente de variación de los análisis repetidos para diferentes determinaciones, el mismo fue inferior a 10%.

8.2.4. Análisis de los datos

8.2.4.1. Análisis estadísticos

Se aplicó el test de Shapiro-Wilks para chequear la normalidad de los datos y no se encontraron distribuciones no normales, por lo que no fue necesario transformar las variables antes de su análisis. Por otro lado, se halló heteroscedasticidad en casi todos los casos, por lo que se la incluyó en el modelo usando Infostat/E acoplado a R para realizar análisis de varianza (ANOVA). Cada vez que el ANOVA indicó diferencias significativas (p<0,05), se llevó a cabo una comparación de medias mediante el test de Tukey. También

se realizaron regresiones lineales múltiples con la finalidad de detectar las variables que determinan la acumulación de Pb en las plantas.

8.2.4.2. Factores de translocación y bioacumulación

Los factores de translocación (FT) y de bioacumulación (FBC) fueron calculados de acuerdo a la bibliografía utilizando la relación entre la concentración de Pb en raíces y parte aérea [$FT = C_{a\acute{e}rea} / C_{ra\acute{i}z}$] y la relación entre la concentración de Pb en la parte aérea de las plantas y la concentración de Pb en los suelos (Fracción pseudototal) [$FBC = C_{a\acute{e}rea} / C_{suelo}$] (Bu-Olayan y Thomas, 2009). Para obtener la concentración de Pb en la parte aérea, los valores encontrados para las hojas y tallos se multiplicaron por la biomasa (BioM) total de cada órgano y fueron sumados entre sí. El resultado se dividió por la biomasa total de los órganos aéreos (tallos más hojas):

$$C_{a\acute{e}rea} = (C_{hoja} \times BioM_{hoja}) + (C_{tallo} \times BioM_{tallo}) / (BioM_{hoja} + BioM_{tallo})$$

8.3. Resultados

8.3.1. Suelo

Los resultados encontrados para pH, CE, %MO y el tamaño de grano (con y sin MO) se muestran en la Tabla 8.1. Las variables pH, CE, y tamaño de grano presentaron interacción estadística entre los sitios de muestreo y los compartimentos del suelo, por lo que el análisis de la varianza (ANOVA) se realizó integrando ambos factores.

Como tendencia general, todos los sitios estudiados presentaron valores de pH de suelo inferiores a 7, los más ácidos fueron los de los sitios 5 y 3, principalmente en el suelo *bulk*, si bien el suelo de la rizosfera de *T. minuta* también mostró valores bajos de pH. Por otro lado, los suelos menos ácidos fueron los de los sitios 1 y 2, mientras que los sitios restantes presentaron valores de pH intermedios.

En cuanto a los valores de CE, los mismos rondaron los $100 \pm 40 \mu\text{s cm}^{-1}$ en la mayoría de los sitios, con pocas excepciones, como los suelos *bulk* en los sitios 4 y 6, que presentaron valores bajos, y la rizosfera de *T. minuta* en el sitio 5 que presentó altos valores de CE coincidente con su bajo pH.

El tamaño medio de grano mostró valores entre 18,9 μm y 49,5 μm , sin que se observara una tendencia clara en relación con los sitios o con los compartimentos del suelo. Para la rizosfera de *T. minuta* se evaluó la capacidad de aglomeración de la materia orgánica, para lo cual se analizó el tamaño de grano con y sin materia orgánica (Tabla 8.1.).

En los sitios 1, 2 y 3 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño de grano medido con materia orgánica o sin ella, por lo que la capacidad de aglomeración de ésta no fue detectable. Sin embargo, en los sitios 4, 5 y 6 sí se encontraron diferencias significativas para el tamaño de grano entre el análisis realizado en suelos que contenían materia orgánica y aquellos en los que ésta se había eliminado. En estos sitios se calculó la capacidad de aglomeración de la materia orgánica como la diferencia entre el tamaño promedio de grano determinado con materia orgánica y el medido luego de la eliminación de la misma, encontrándose que en el caso más extremo (sitio 6) la materia orgánica incrementa en 32,6 μm el tamaño promedio de los granos del suelo, lo cual corresponde a un valor 168% más alto que el obtenido para el mismo suelo sin la presencia de materia orgánica.

Los resultados correspondientes a %MO mostraron diferencias significativas entre sitios, siendo los sitios 4 y 6 los que mayores porcentajes de materia orgánica presentaron. Esto confirmaría que la capacidad de aglomeración de las partículas del suelo puede relacionarse con el contenido de MO. Por otra parte, la rizosfera de *B. pilosa* mostró %MO más elevados que los suelos *bulk* y de la rizosfera de *T. minuta*.

Tabla 8.1. Valores promedio \pm desvíos estándar y resultados de ANOVA para las variables pH, porcentaje de materia orgánica (%MO), conductividad eléctrica (CE), tamaño de grano con y sin materia orgánica y cálculo de la aglomeración de granos por la presencia de materia orgánica, correspondiente a los compartimientos del suelo (*bulk* y rizosfera de *T. minuta*) en los sitios de estudio en Bouwer, Córdoba, Argentina.

Sitio	Compartimento	pH (*)	%MO	CE ($\mu\text{s cm}^{-1}$) (***)	Tamaño de Grano (μm) (***)	Tamaño de grano-MO (μm)	Aglomeración orgánica (μm)
1	<i>Bulk</i>	6,8 \pm 0,1 a	14 \pm 1 B	83 \pm 12 c	25 \pm 2 c	-	-
	Riz (<i>B. pilosa</i>)	7,0 \pm 0,1 a	18,1 \pm 0,2 B	113 \pm 27 c	27,8 \pm 0,2 c	-	-
	Riz (<i>T. minuta</i>)	6,78 \pm 0,04 a	14 \pm 2 B	80 \pm 17 c	27 \pm 3 c	35 \pm 4	8 ^{ns}
2	<i>Bulk</i>	6,68 \pm 0,01 b	16 \pm 3 B	62 \pm 12 c	31 \pm 1 b	-	-
	Riz (<i>B. pilosa</i>)	6,8 \pm 0,2 a	23 \pm 5 B	157 \pm 37 b	32 \pm 2 b	-	-
	Riz (<i>T. minuta</i>)	6,8 \pm 0,1 a	17 \pm 1 B	89 \pm 12 c	31 \pm 7 b	42 \pm 6	11 ^{ns}
3	<i>Bulk</i>	5,8 \pm 0,6 e	11,0 \pm 0,2 B	104 \pm 61 c	31,0 \pm 0,4 b	-	-
	Riz (<i>B. pilosa</i>)	6,2 \pm 0,2 d	14 \pm 1 B	82 \pm 27 c	31,70 \pm 0,01 b	-	-
	Riz (<i>T. minuta</i>)	5,96 \pm 0,03 e	12 \pm 1 B	72 \pm 14 c	49,2 \pm 0,4 a	43 \pm 3	-6 ^{ns}
4	<i>Bulk</i>	6,13 \pm 0,01 d	25 \pm 1 A	46 \pm 3 d	48 \pm 1 a	-	-
	Riz (<i>B. pilosa</i>)	6,2 \pm 0,1 d	37 \pm 7 A	140 \pm 9 b	21,0 \pm 0,4 d	-	-
	Riz (<i>T. minuta</i>)	6,4 \pm 0,2 c	29 \pm 4 A	103 \pm 2 c	20 \pm 1 d	41 \pm 1	21 ^{***}
5	<i>Bulk</i>	4,8 \pm 0,6 f	15 \pm 3 B	117 \pm 5 c	21 \pm 1 d	-	-
	Riz (<i>B. pilosa</i>)	6,23 \pm 0,05 d	26 \pm 9 B	95 \pm 27 c	26,7 \pm 0,7 c	-	-
	Riz (<i>T. minuta</i>)	5,62 \pm 0,05 f	18 \pm 1 B	510 \pm 48 a	28 \pm 3 c	44 \pm 3	16 [*]
6	<i>Bulk</i>	6,5 \pm 0,1 c	17 \pm 1 b B	40 \pm 4 d	25,2 \pm 0,2 c	-	-
	Riz (<i>B. pilosa</i>)	6,6 \pm 0,1 c	22 \pm 4 b B	57 \pm 2 c	28 \pm 3 c	-	-
	Riz (<i>T. minuta</i>)	6,41 \pm 0,01 c	28 \pm 1 a A	69 \pm 2 c	19,4 \pm 0,6 d	52 \pm 7	32,6 [*]
ANOVA ^a		Interacción	<i>Bulk</i> (**) Riz-Bp (*) Riz-Tm (***)	Interacción	Interacción		
ANOVA ^b		Interacción	sitio 6 (*)	Interacción	Interacción		

Letras diferentes indican diferencias significativas. Niveles de significancia: ns, no significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Para %MO, las letras mayúsculas corresponden a la comparación entre sitios (ANOVA^a), y las minúsculas a la comparación entre compartimentos dentro de cada sitio (ANOVA^b, solo se presenta en el caso significativo: sitio 6). Para las variables con interacción se realizó un único ANOVA con letras minúsculas. La aglomeración se calculó como diferencia en el tamaño de grano con y sin MO cuando estos valores fueron significativamente diferentes. Abreviaturas: Riz-Bp: suelo rizosférico de *B. pilosa*; Riz-Tm: suelo rizosférico de *T. minuta*.

En la Tabla 8.2. se presentan los resultados de la concentración pseudototal de Pb, Cu y Zn en los suelos estudiados en la localidad de Bouwer. Las concentraciones de Cu y Zn se encontraron dentro de los límites permitidos por la legislación argentina para los usos agrícola, residencial e industrial del suelo (Argentina, 1993). No obstante, los valores encontrados en este muestreo fueron algo superiores a los observados para la fracción pseudototal de los mismos metales en el Capítulo I en los sitios comunes. Esto posiblemente se relacione con los métodos de medición empleados ya que las determinaciones se realizaron con metodologías diferentes en cada caso (Espectrometría de Absorción Atómica de llama en el Capítulo I y Fluorescencia de Rayos X - Reflexión total, en este capítulo). Por otra parte, la distribución espacial de Cu y Zn pseudototales en el área de estudio fue relativamente homogénea, sin diferencias significativas entre la mayoría de los sitios ni entre los compartimentos del suelo. Se observó únicamente una concentración ligeramente más elevada en el contenido de Cu en la rizosfera de *T. minuta* del sitio 3, y un déficit de dicho elemento en los suelos rizosféricos de ambas especies en el sitio 6. Para Zn se encontraron valores más altos de concentración en la rizosfera de *B. pilosa* de los sitios 1 y 2. Estas ligeras fluctuaciones en el contenido de dichos elementos pueden estar dentro de la variabilidad natural de los suelos (Wopereis et al., 1988).

Para las concentraciones de Pb pseudototal, todos los sitios superaron el límite que fija la legislación para suelos de uso agrícola (375 mg kg^{-1} PS), la mayoría de los sitios superaron el límite de uso residencial (500 mg kg^{-1} PS), y varios (1, 2, 3, 5) superaron también los límites fijados para uso industrial (1000 mg kg^{-1} PS). Estas concentraciones inusualmente elevadas revelan la contaminación por Pb en el área de estudio (Salazar y Pignata, 2014), y permiten explicar los altos valores de desviación estándar para dicho metal en los suelos estudiados. Por otra parte, la concentración de Pb pseudototal en suelos presentó interacción estadística entre los factores “sitio” y “compartimento”. La comparación de medias mostró que los sitios 2 y 5 presentaron concentraciones significativamente más altas de Pb que el resto de los sitios estudiados en los tres compartimentos, con un valor máximo alcanzado en el suelo *bulk* del sitio 5 (6990 mg kg^{-1} PS).

En la Figura 8.2. se muestran los resultados para la distribución de Pb (A), Zn (B) y Cu (C) en las 5 fracciones de suelo analizadas, después de la extracción secuencial de dichos

metales. Los resultados para la concentración de Pb en la fracción 1 mostraron interacción estadística entre los sitios y compartimentos del suelo. Los valores más elevados para el Pb biodisponible (fracción 1) se hallaron en los suelos *bulk* del sitio 5, en el suelo *bulk* y también en el rizosférico de *T. minuta* en el sitio 2 y en el *bulk* del sitio 3. La concentración de Pb en la fracción 2 no mostró interacción entre los factores, y sólo el factor “sitio” presentó diferencias significativas. En esta fracción todos los sitios mostraron similares concentraciones para el contenido de Pb, excepto el sitio 5 que presentó concentraciones significativamente más elevadas. Es importante señalar que los metales extraídos en las fracciones 1 y 2 comprenden los potencialmente disponibles para los organismos, especialmente para las plantas. En este contexto resulta importante haber detectado que estas dos fracciones en los sitios 2, 3 y 5 representaron entre el 25 y 50% del contenido total de Pb en suelos (fracción pseudototal), mientras que la fracción 3 concentró la mayoría de Pb pseudototal del suelo en los demás sitios estudiados (Fig. 8.2.A). Estos resultados no solo muestran las diferencias en la biodisponibilidad del metal entre los sitios, sino que además indican su origen (geogénico o antrópico).

El contenido de Pb en la fracción 3 mostró interacción estadística entre los factores “sitio” y “tipo de suelo”, con máximos valores en los suelos rizosféricos de *T. minuta* en los sitios 2 y 5, seguidos de los demás compartimentos de esos mismos sitios. Finalmente el resto de los sitios presentaron valores de concentración similares entre sí e inferiores a los antes citados. La fracción 4 también presentó interacción entre los factores, con una concentración de Pb significativamente mayor en los sitios 2 y 5, siendo más importante en la rizosfera de *T. minuta* del sitio 2 y en la de *B. pilosa* del sitio 5. Por último la concentración de Pb en la fracción 5, también con interacción, fue relativamente baja en todos los sitios estudiados al compararla con las otras 4 fracciones, salvo en el sitio 6 donde se encontraron los mayores niveles de concentración del metal en esta fracción.

Las concentraciones de Cu y Zn en las distintas fracciones del suelo (Fig. 8.2. B y C respectivamente), al igual que se observó en la fracción pseudototal de estos metales, fueron muy similares en todos los sitios, no obstante se encontraron algunas diferencias significativas. Las muestras con mayor concentración de Cu en la fracción 1 fueron las de rizosfera de *B. pilosa* en el sitio 3 y la de rizosfera de *T. minuta* en el sitio 4. Buffa y Ratto (2005) estudiaron la concentración de Cu y Zn en fracción disponible del suelo en la

provincia de Córdoba mediante una extracción con DTPA, comparable a la fracción 1 de esta tesis. Los resultados encontrados por estos autores en suelos superficiales de la región “Pampa Loessica Alta, subregión pampeana”, en donde se encuentra Bouwer, fueron 1,6 mg kg⁻¹ para Cu y 0,9 mg kg⁻¹ para Zn. Estos valores son menores a los encontrados en esta tesis aunque se encuentran en el mismo orden de magnitud. Para la fracción 2, los valores máximos de Cu se encontraron en los suelos *bulk* de los sitios 4 y 5. En el contenido de Cu de la fracción 3 no hubo incidencia del sitio, pero sí del compartimento, encontrándose una tendencia significativa, repetida en todos los sitios, que muestra un decaimiento desde el suelo *bulk* hacia el de la rizosfera. Esto podría indicar una marcada incorporación de este elemento en las especies estudiadas, lo cual reduciría significativamente la concentración de Cu en suelo en torno a la raíz, pero también muestra que las plantas estudiadas tienen acceso a la fracción 3 de este elemento (unida a óxidos de Fe y Mn). En cuanto a Zn, la mayor concentración en la fracción 1 se encontró para la rizosfera de *B. pilosa* en los sitios 1 y 3; y la más alta concentración de Zn en la fracción 2, se encontró para la rizosfera de *T. minuta* en el sitio 3.

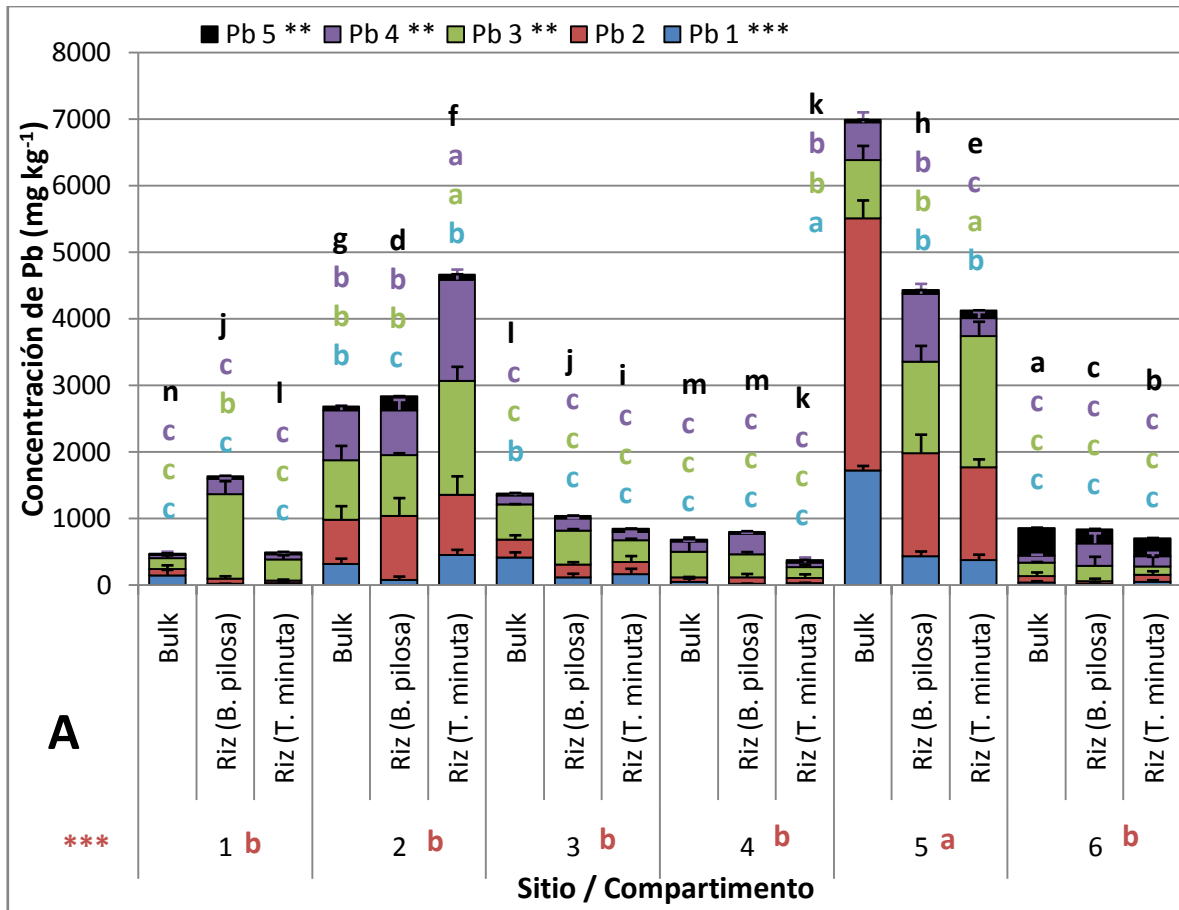
Paralelamente a los análisis de la varianza (ANOVA) realizados en esta parte del estudio, se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman entre las concentraciones de los tres elementos en las cinco fracciones, no habiéndose encontrado correlaciones significativas que muestren una asociación entre la dinámica de estos metales en el suelo.

Tabla 8.2. Concentración de los metales pesados Pb, Zn y Cu (fracción pseudototal) en los compartimentos del suelo (*bulk* y rizosfera de *Bidens pilosa* y de *Tagetes minuta*) en suelos próximos a una fundición de plomo en Bouwer, Córdoba, Argentina. ANOVA comparando los resultados entre sitios y compartimentos.

Sitio	Compartimento	Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)
1	<i>Bulk</i>	472±266 c	69±9 b	39±9 b
	Riz (<i>B. pilosa</i>)	1638±410 c	44±7 b	72±10 a
	Riz (<i>T. minuta</i>)	494±120 c	37±5 b	30±6 b
2	<i>Bulk</i>	2686±406 b	66±7 b	64±11 b
	Riz (<i>B. pilosa</i>)	2835±195 b	51±2 b	100±14 a
	Riz (<i>T. minuta</i>)	4667±600 b	55±9 b	38±12 b
3	<i>Bulk</i>	1378±300 c	41±8 b	50±12 b
	Riz (<i>B. pilosa</i>)	1040±145 c	32±1 b	42±10 b
	Riz (<i>T. minuta</i>)	845±136 c	78±8 a	54±9 b
4	<i>Bulk</i>	685±411 c	64±6 b	44±10 b
	Riz (<i>B. pilosa</i>)	796±312 c	60±4 b	30±4 b
	Riz (<i>T. minuta</i>)	360±162 c	52±10 b	48±4 b
5	<i>Bulk</i>	6990±628 a	57±9 b	32±11 b
	Riz (<i>B. pilosa</i>)	4429±583 b	50±11 b	56±16 b
	Riz (<i>T. minuta</i>)	4125± 632 b	36±10 b	51±14 b
6	<i>Bulk</i>	858±151 c	52±8 b	45±13 b
	Riz (<i>B. pilosa</i>)	839±412 c	17± 9 c	40±7 b
	Riz (<i>T. minuta</i>)	703±207 c	18±1 c	34±12 b
ANOVA		*	***	*

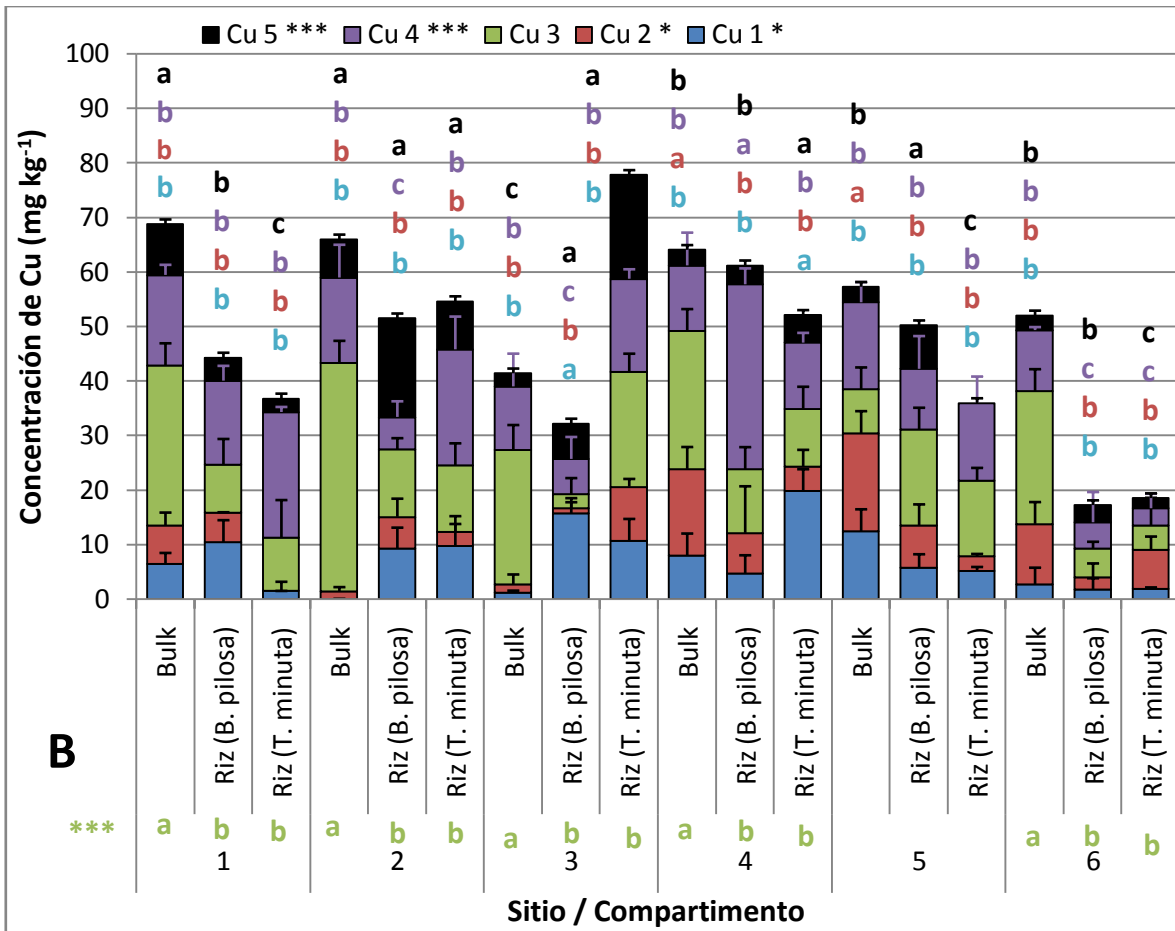
Los valores en las columnas con letras iguales difieren significativamente a un nivel de $p < 0,05$. Hubo interacción estadística para los tres elementos. Niveles de significancia: ns, no significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Abreviaturas: Riz-Bp: suelo rizosférico de *B. pilosa*; Riz-Tm: suelo rizosférico de *T. minuta*.

Figura 8.2. Resultados de la extracción secuencial de metales pesados en suelos contaminados con Pb de Bouwer, Córdoba, Argentina. A) Concentraciones de Pb en las fracciones (1 a 5) del suelo.



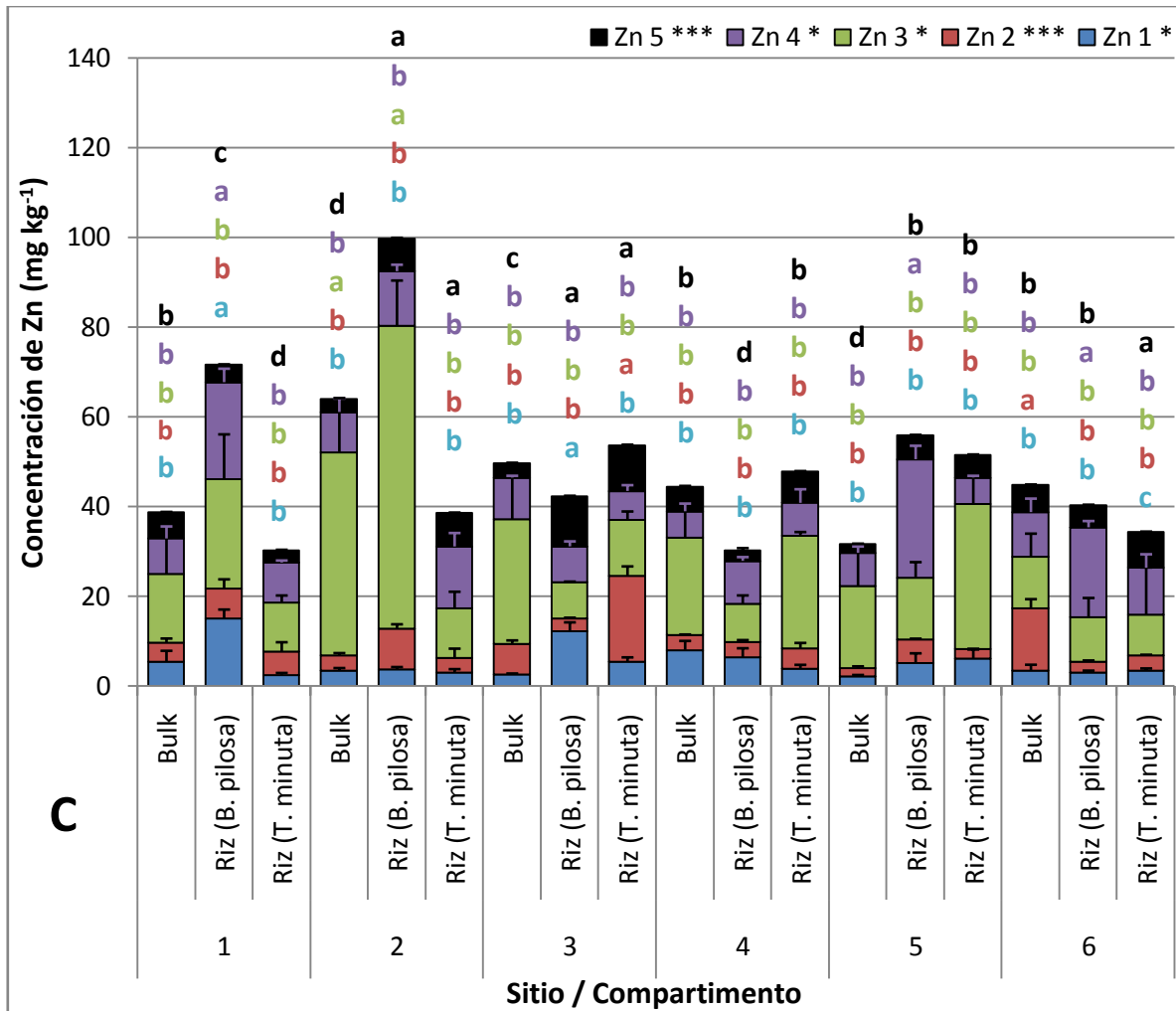
Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) o $p < 0,001$ (***). El número de cada serie representada indica la fracción de suelo estudiada. Las fracciones 1; 3; 4 y 5 presentaron interacción estadística, la fracción 2 sólo presentó diferencias significativas para el factor “sitio”. El color de las letras indica la serie para la cual corresponde el análisis realizado.

Figura 8.2. (Continuación). Resultados de la extracción secuencial de metales pesados en suelos contaminados con Pb de Bouwer, Córdoba, Argentina. B) Concentraciones de Cu en las fracciones (1 a 5) del suelo.



Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) o $p < 0,001$ (***). El número de cada serie representada indica la fracción de suelo estudiada. Las fracciones 1; 2; 4 y 5 presentaron interacción estadística, la fracción 3 sólo presentó diferencias significativas para el factor “compartimento”. El color de las letras indica la serie para la cual corresponde el análisis realizado.

Figura 8.2. (Continuación). Resultados de la extracción secuencial de metales pesados en suelos contaminados con Pb de Bouwer, Córdoba, Argentina. C) Concentraciones de Zn en las fracciones (1 a 5) del suelo.



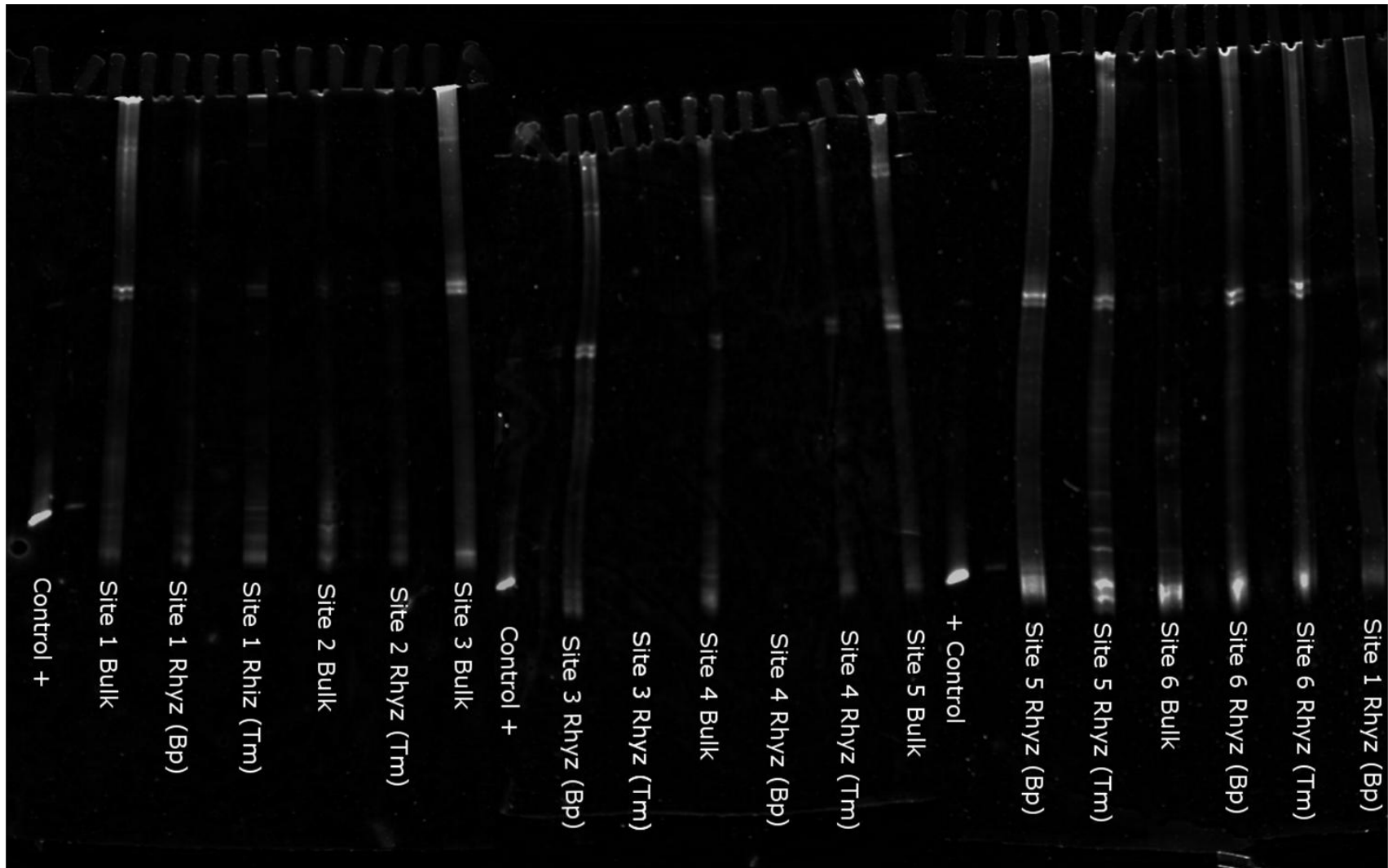
Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) o $p < 0,001$ (***). El número de cada serie representada indica la fracción de suelo estudiada. Todas las fracciones presentaron interacción estadística. El color de las letras indica la serie para la cual corresponde el análisis realizado.

En relación a los resultados obtenidos en el estudio de la diversidad bacteriana de los suelos, la misma fue similar en los seis sitios analizados y en los tres compartimentos, habiéndose detectado entre 4 y 6 bandas por muestra (Figura 8.3.). Sólo en el sitio 5 se observó una diversidad significativamente mayor, con 10 bandas, en la rizosfera de *T. minuta*, resultado importante pues dicho sitio, el más cercano a la fundición, fue el que presentó las mayores concentraciones de Pb en suelo. Cabe destacar que los suelos de este sitio presentaron, también, los valores más altos de conductividad eléctrica, resultado que

se asocia con una mayor concentración de electrolitos solubles. Estos resultados indicarían que los microorganismos presentes en ese sitio podrían favorecer la disolución y movilidad de los metales. Por otro lado, en este sitio la rizosfera de *T. minuta* mostró concentraciones de Pb y Cu en la fracción psudototal, inferiores a las de estos metales en el *bulk*, (Figuras 8.2. A y B), reducción asociada con la disminución de las concentraciones en las fracciones 1 y 2. Integrando los resultados de la extracción secuencial de metales en suelos, los de diversidad microbiana y los de conductividad eléctrica, con los resultados encontrados en capítulos anteriores para cada uno de los experimentos de acumulación y translocación de metales en las especies estudiadas, se sugiere que los microorganismos presentes en el suelo del sitio 5 participarían activamente en la movilización del Pb. Fenómeno que se ve reflejado en los mayores niveles de acumulación de Pb en la raíz y que se relaciona con la disminución en la concentración del metal en las fracciones 1 y 2 del suelo rizosférico.

Por otro lado en las corridas electroforéticas (Figura 8.3.), se observaron dos bandas que estuvieron presentes en todas las muestras (todos los sitios y todos los compartimentos), indicando la presencia de dos especies de bacterias que toleran concentraciones extremas de Pb en suelo.

Figura 8.3. Fotografía de los geles electroforéticos obtenidos mediante la técnica de DGGE para el gen bacteriano 16 S rRNA de microorganismos provenientes de suelos contaminados con Pb de Bouwer, Córdoba, Argentina.

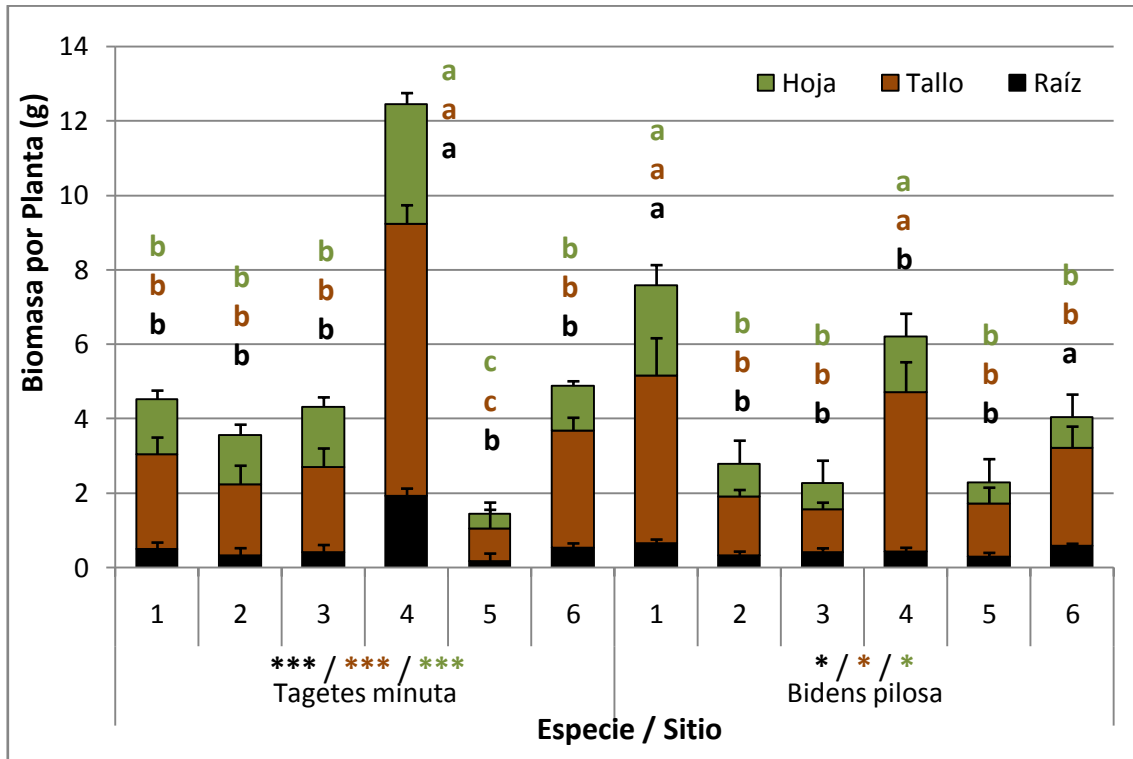


8.3.2. Biomasa y metales pesados en plantas

En la Figura 8.4. se presentan los resultados de la producción de biomasa en plantas de *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* colectadas en los sitios 1 a 6 de la localidad de Bouwer, Córdoba. *T. minuta* mostró diferencias significativas en la producción de biomasa seca entre los sitios de muestreo con el siguiente orden, tanto en hojas, como en tallo y raíces: 4, 6 > 1, 3, 2 > 5. La producción de biomasa en hojas, tallo y raíz de *B. pilosa* también mostró diferencias significativas entre los sitios, siendo el orden en este caso: 1, 4 > 6 > 2, 3, 5.

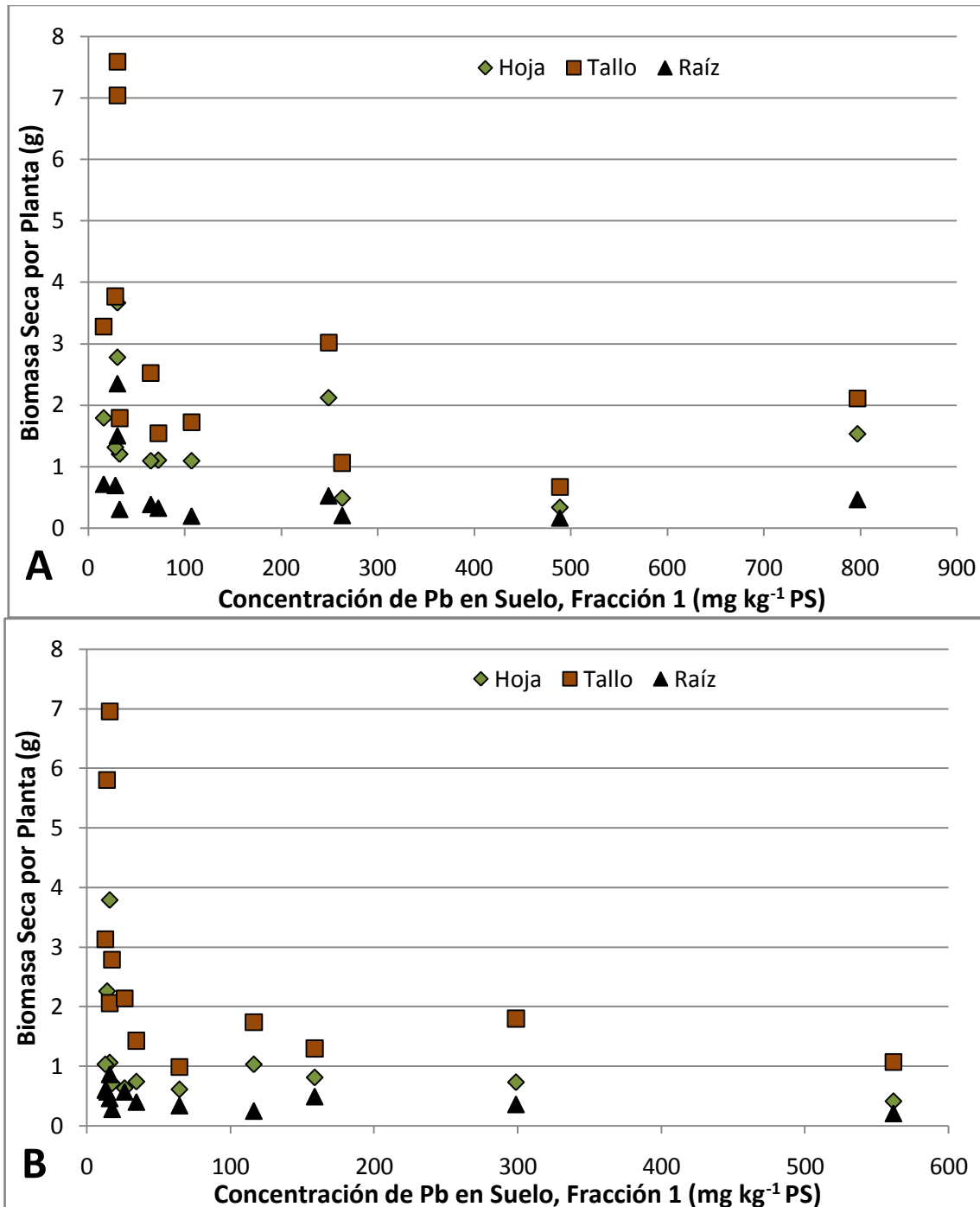
En la Figura 8.5. (A) y (B) se muestran los resultados para la producción de biomasa de *T. minuta* (A) y *B. pilosa* (C) en relación a la concentración creciente de la fracción 1 de Pb en suelos. En dicha figura puede apreciarse que a mayor contenido de Pb en la fracción 1 del suelo el desarrollo de biomasa de ambas especies se redujo en los tres órganos estudiados, es decir que el metal introdujo un efecto inhibitorio en el crecimiento de las mismas. En presencia de concentraciones de Pb en la fracción 1 del suelo superiores a 50 mg kg⁻¹, *B. pilosa* presentó, en todos los casos, una biomasa foliar inferior a 1 g por planta, mientras que *T. minuta* presentó una biomasa foliar superior a 2 g por planta cuando la concentración en suelo era de 250 mg kg⁻¹ y superior a 1 g por planta cuando la concentración en suelo era de 800 mg kg⁻¹. Esta misma diferencia relativa entre las especies se repite para el caso de la biomasa de tallo. Es decir que al comparar las especies entre ellas, *T. minuta* mostró un mayor nivel de tolerancia al Pb biodisponible en suelo que *B. pilosa*.

Figura 8.4. Producción de biomasa por planta de *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* cuando crecen en suelos con concentraciones crecientes de Pb (pseudototal).



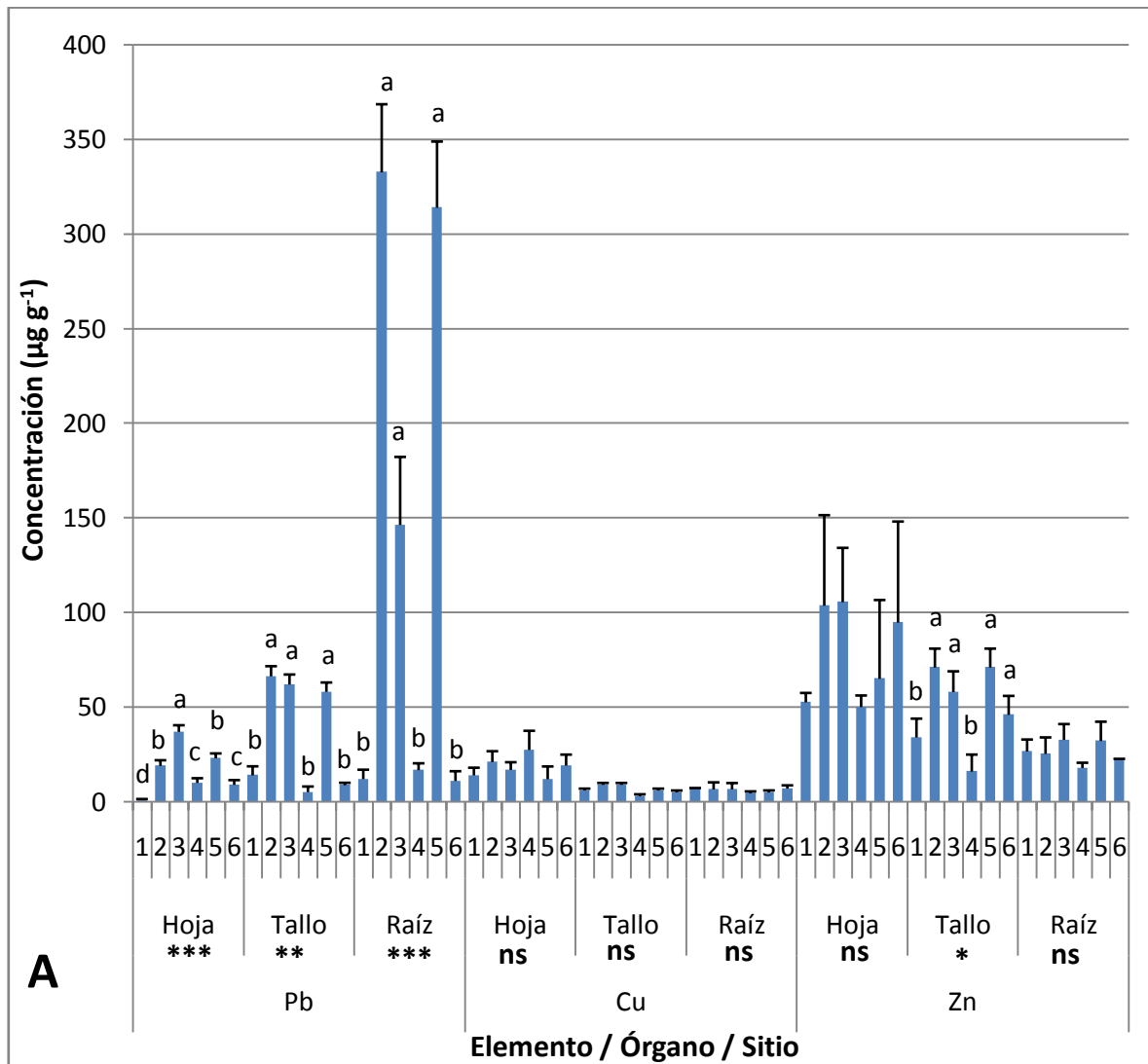
Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) o $p < 0,001$ (***). El color de las letras indica el órgano para la cual corresponde el análisis.

Figura 8.5. Producción de biomasa por planta de *Tagetes minuta* (A) y *Bidens pilosa* (B) cuando crecen en suelos con concentraciones crecientes de Pb en la fracción biodisponible (fracción 1).



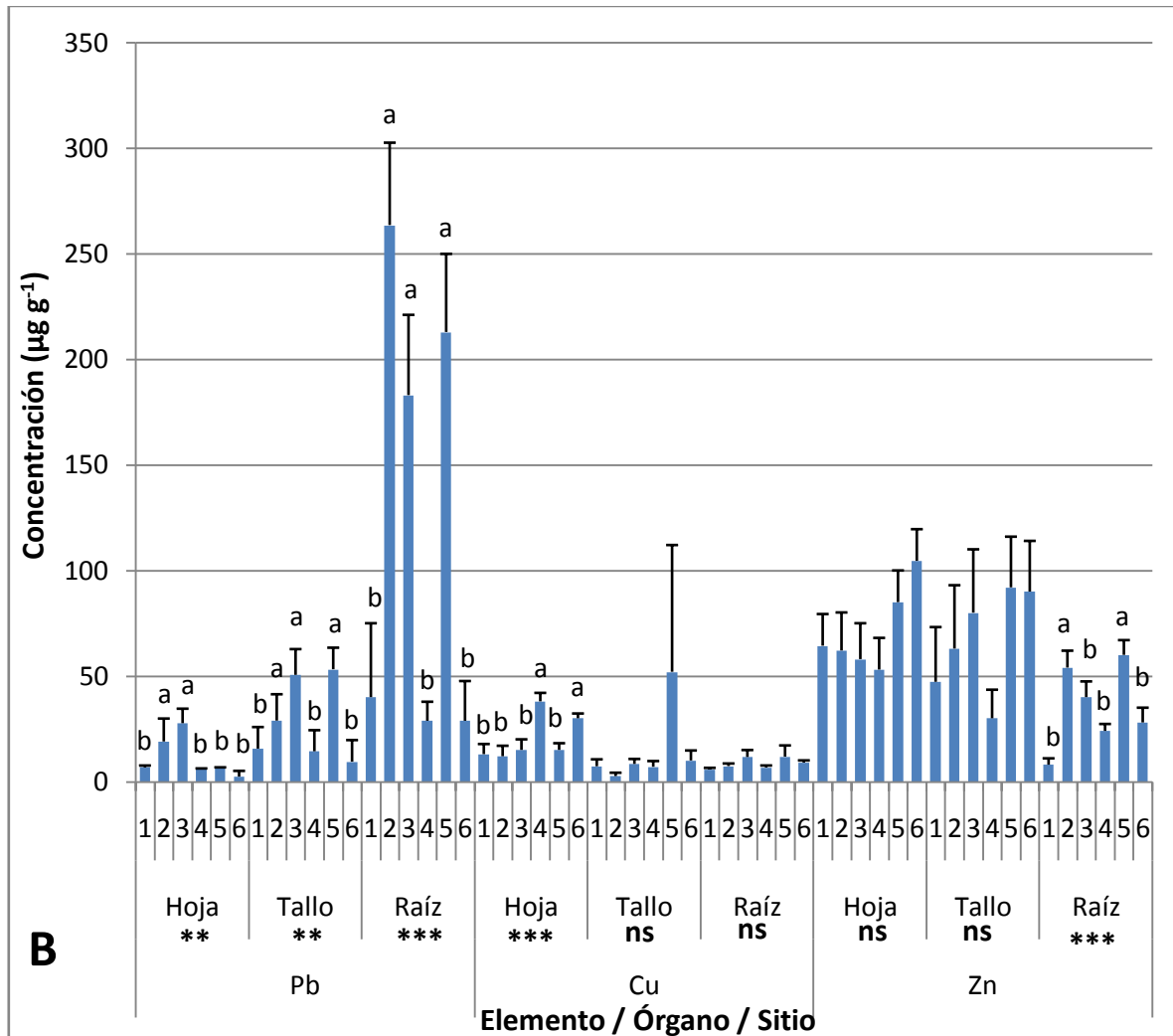
Los resultados de la concentración de Pb, Zn y Cu en los distintos órganos de plantas de *T. minuta* (A), y *B. pilosa* (B) que crecen en los sitios 1 a 6 de la localidad de Bouwer, se muestran en la Figura 8.6. En ambas especies las concentraciones de Pb en los tres órganos presentaron el mismo patrón, alcanzándose mayores concentraciones en éstos en los sitios 2, 3 y 5. Para Cu los resultados fueron similares en ambas especies en todos los sitios y sólo se detectaron diferencias significativas para *B. pilosa* en hojas, las que presentaron mayores concentraciones de Cu en los sitios 4 y 6, coincidiendo estos con los de menores valores de concentración de Pb. Las concentraciones de Zn en los distintos órganos mostraron diferencias significativas entre sitios con valores superiores en tallos de *T. minuta* para los sitios 2, 3, 5, y 6; y en raíces de *B. pilosa* en los sitios 2 y 5, donde esta especie mostró, al mismo tiempo, los mayores niveles de Pb. Ambas especies acumularon plomo principalmente en raíces, seguido de tallos y finalmente de hojas.

Figura 8.6. A) Concentraciones de Pb, Zn y Cu en hojas, tallos y raíces de *Tagetes minuta* cuando crece en suelos con distintas concentraciones de Pb (pseudototal).



Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) o $p < 0,001$ (***) entre sitios para cada órgano y cada metal. ns: no significativo

Figura 8.6. (Continuación). B) Concentraciones de Pb, Zn y Cu en hojas, tallos y raíces de *Bidens pilosa* cuando crece en suelos con distintas concentraciones de Pb (pseudototal).

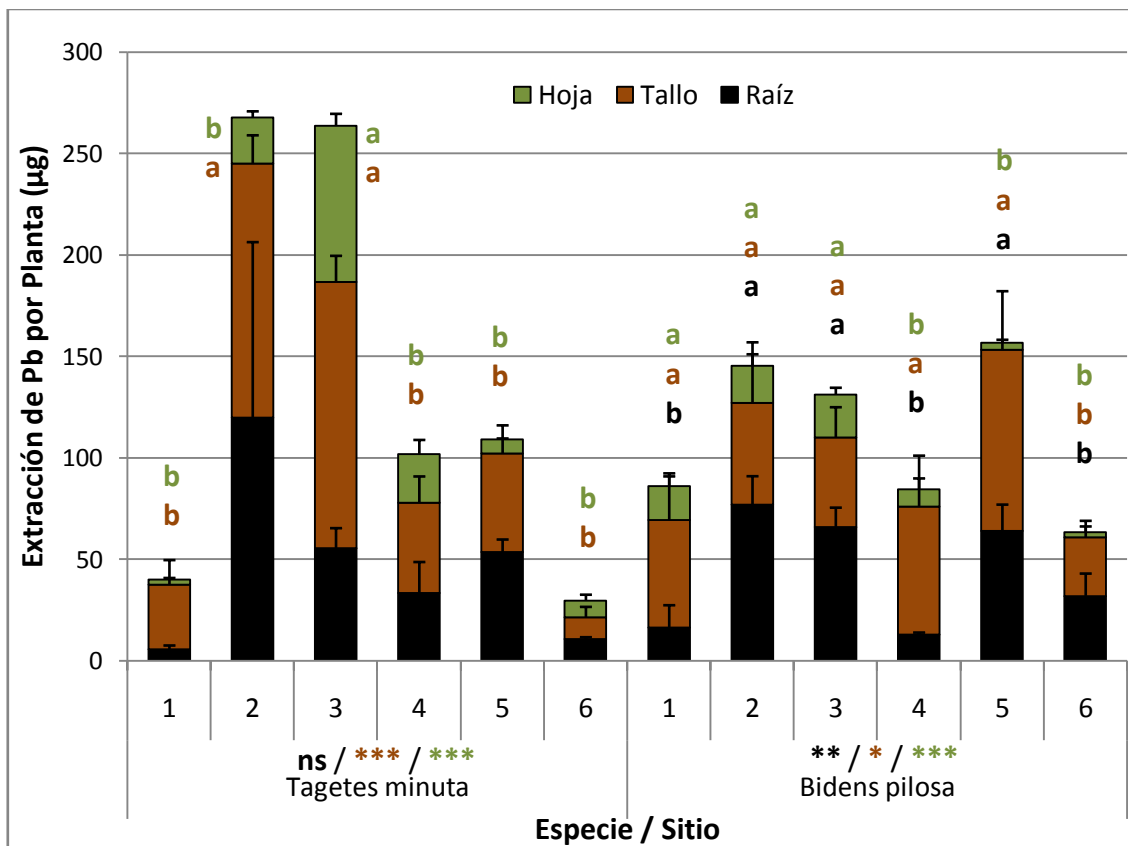


Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) o $p < 0,001$ (***) entre sitios para cada órgano. ns: no significativo.

En cuanto a la extracción total de plomo por planta y su distribución entre los distintos órganos, *T. minuta* extrajo más Pb que *B. pilosa* fundamentalmente en los sitios 2 y 3 (Figura 8.7.). *T. minuta* presentó diferencias significativas entre los sitios para la acumulación de Pb en hojas (3 > 2, 4, 1, 5, 6) y en tallo (3, 2 > 5, 4, 6, 1). Esto se tradujo en una extracción total de Pb por planta significativamente mayor para *T. minuta* en los sitios 2 y 3 (Figura 8.7.). Los resultados del ANOVA entre los sitios para *B. pilosa* indicaron diferencias significativas de los niveles de Pb en raíz, tallo y hoja, aunque la tendencia no fue la misma en los tres órganos integrados, la extracción total de Pb por

planta de *B. pilosa* fue superior en los sitios 2, 3 y 5, debiéndose principalmente a una mayor acumulación localizada en la raíz (Figura 8.7.).

Figura 8.7. Extracción de Pb por planta en *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* cuando crecen en suelos con distintas concentraciones de Pb (pseudototal) en Bouwer.



Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) o $p < 0,001$ (***) para la cantidad de Pb extraída en cada órgano por cada especie entre los diferentes sitios. ns: no significativo. Los colores de las letras indican el órgano que corresponde al análisis.

8.3.3. Factores de bioacumulación y de translocación

Los resultados para los factores de bioacumulación (FBC) y de translocación (FT R-A) calculados para *T. minuta* y *B. pilosa* se muestran en la Tablas 8.3. y 8.4. respectivamente. En su interpretación un valor de FT > 1 indica una eficaz translocación del metal desde la raíz a la parte aérea; mientras que un valor de FBC > 10 indica que estamos ante una especie hiperacumuladora, un valor de FBC > 1 frente a una especie acumuladora y un FBC < 1 ante una especie exclusiva del metal en estudio (Bu-Olayan y Thomas, 2009). El FBC se calculó utilizando la concentración de Pb pseudototal en suelos como lo indica la

bibliografía. La concentración del metal en esta fracción corresponde a la forma en que se legislan los niveles de plomo según los distintos usos del suelo. Ninguna de las especies mostró un comportamiento que permita considerarlas acumuladoras, según los FBC calculados de acuerdo a la bibliografía.

Un resultado similar arrojaron los FT R-A calculados, ya que ninguna de las especies translocó eficientemente Pb desde la raíz hacia la parte aérea. Sin embargo, este resultado contrasta con los resultados encontrados en la distribución de plomo en los distintos órganos de las especies estudiadas (Figura 8.7.), donde *B. pilosa* mostró una acumulación del 60% del Pb extraído del suelo en la parte aérea, porcentaje que en *T. minuta* superó el 70%. Por esta razón, consideramos que los Factores de Translocación propuestos por la bibliografía no reflejan la capacidad que posee una especie vegetal para extraer plomo del suelo. Esta discrepancia con la bibliografía se sustenta en que es incorrecto referir la extracción de un metal del suelo en términos de “concentración” del metal cuando las matrices de los dos sistemas son diferentes. Es decir, una especie puede presentar una baja concentración de un metal en sus órganos aéreos y sin embargo, debido a la elevada producción de biomasa, ser una eficiente extractora del mismo. Por otra parte, y en relación al FBC, un metal medido en la fracción pseudototal puede presentar elevadas concentraciones en suelo y estar mayoritariamente en formas químicas no disponibles para las plantas.

Por lo anteriormente citado, consideramos que los factores de translocación y de bioacumulación, ampliamente utilizados en la Bibliografía no son apropiados en la evaluación de la capacidad fitoextractora de especies potencialmente acumuladoras de metales pesados, aptas para su empleo en la fitorremediación de suelos contaminados.

Con la finalidad de resolver estas discrepancias calculamos la masa del metal extraída del suelo por planta en relación a la fracción biodisponible del mismo en suelos (fracción 1), y determinamos la masa del metal que se translocó desde un órgano a otros en vez de emplear la medida de su concentración. La transformación de la concentración en masa neta del metal extraído o translocado reflejó fidedignamente la cantidad del metal que era extraído del suelo en cada caso y cuánto se translocaba desde la raíz a los órganos aéreos.

Así, los resultados obtenidos nos permiten proponer dos nuevos factores, relacionados éstos con la capacidad que poseen las distintas especies vegetales tanto para extraer un metal de suelo como para translocarlo dentro de la planta:

1. Factor de Bioextracción

$$FBE = \frac{C_{hojas} \cdot BioM_{hojas} + C_{tallo} \cdot BioM_{tallo}}{C_{Fracción\ 1\ Suelo\ Rizosférico}}$$

donde C es la concentración de un metal pesado en hojas, tallo, raíz o en la fracción 1 del suelo rizosférico de esa especie vegetal, en $\mu\text{g. g}^{-1}$ PS y BioM es la biomasa de esos órganos (g PS).

Este factor se propone en reemplazo del factor de bioconcentración (FBC), el que se calcula como el cociente entre la concentración del metal en la parte aérea de la planta (tallos y hojas) y la concentración del mismo metal en la fracción pseudototal del suelo. Una de las deficiencias del FBC para evaluar la capacidad fitoextractora de una especie, es que no tiene en cuenta la biomasa producida por las plantas. Por otra parte, en suelos donde la concentración del metal es baja o moderada el FBC funciona relativamente bien, pero en suelos con elevadas concentraciones del metal, incluso las especies que acumulan cantidades sorprendentemente elevadas del mismo presentan valores muy bajos de FBC. Otra limitante del FBC es que no es representativo de las diferencias en la capacidad que presentan las distintas especies para producir biomasa en condiciones de estrés por metales pesados, criterio de fundamental importancia para definir la eficiencia fitoextractora de una especie. Por último, consideramos que la masa de metal extraído por una planta no se relaciona con la concentración pseudototal del metal en el suelo, sino con la concentración del mismo en la fracción intercambiable o móvil (fracción 1). Atendiendo a estos puntos críticos sobre el FBC, la propuesta del Factor de Bioextracción se sustenta entonces, en la valoración de la eficiencia de una especie vegetal para su empleo en fitorremediación de suelos contaminados, definida ésta en términos de la masa neta de metal que una planta puede extraer en su parte aérea a partir de la cantidad del metal disponible que se encuentre en el suelo rizosférico con el que interactúe.

Tabla 8.3. Factor de bioacumulación (FBC) en relación a la concentración de Pb en suelo (pseudototal y fracción 1) y Factor de Bioextracción (FBE) (Valores medios ± desvío estándar) para *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* cuando crecen en suelos contaminados en Bouwer, Córdoba.

Sitio	<i>Tagetes minuta</i>			<i>Bidens pilosa</i>		
	FBC (Pseudo-total)	FBE (Pseudo-total)	FBE (Fracción 1)	FBC (Pseudo-total)	FBE (Pseudo-total)	FBE (Fracción 1)
1	0,018±0,002	0,09 ± 0,03	1,96 ± 0,99	0,007±0,004	0,05 ± 0,01	5,35 ± 0,32
2	0,01±0,0004	0,06 ± 0,03	1,13 ± 0,82	0,009±0,008	0,05 ± 0,03	2,12 ± 0,44
3	0,06±0,01	0,30 ± 0,04	2,07 ± 1,04	0,04±0,0004	0,15 ± 0,02	1,59 ± 0,59
4	0,02±0,009	0,33 ± 0,19	3,30 ± 0,68	0,016±0,0003	0,10 ± 0,04	5,46 ± 2,72
5	0,012±0,004	0,03 ± 0,02	0,33 ± 0,14	0,008±0,003	0,03 ± 0,01	0,48 ± 0,43
6	0,011±0,003	0,06 ± 0,00	1,23 ± 0,80	0,013±0,001	0,07 ± 0,05	2,91 ± 1,82

2. Factor de Transferencia Total desde la raíz a la parte aérea de la planta (FTT R-A):
el mismo se basa en la masa del metal que se transloca desde la raíz a la parte aérea.
Se calcula de la siguiente manera:

FTT R-A:

$$FTT R - A = \frac{C_{hojas} \cdot BioM_{hojas} + C_{tallo} \cdot BioM_{tallo}}{C_{raíz} \cdot BioM_{raíz}}$$

donde C es la concentración de un metal en hojas, tallo o raíz en $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ PS y BioM es la biomasa de esos órganos (g PS). Este factor refleja la tasa de extracción de una planta en la parte aérea ya que tiene en cuenta la masa de metal extraída en función de la biomasa de las plantas. Este factor se propone en reemplazo de los factores de translocación que se emplean hasta el momento, y como se explicó para el FBE, este nuevo factor no tienen en cuenta concentración sino masa del metal translocada por planta. Los FT citados en bibliografía, al considerar concentraciones, pueden indicar que una especie es más eficiente como acumuladora y translocadora de metales cuando en realidad, extrae y transloca una cantidad absoluta más pequeña del metal. Por otra parte, la concentración de un metal en los distintos órganos de la planta, si bien representa una medida de la cantidad del mismo en relación a una unidad de masa del tejido vegetal, no indica la masa de ese metal (g) que fue extraída del suelo.

El factor de transferencia total propuesto (FTT) fue calculado con los datos obtenidos en este estudio y fue comparado con los FT calculados según la bibliografía. Los resultados se presentan en la Tabla 8.4. y muestran que el FTT, así como mostraba el análisis de los factores individuales analizados en este capítulo, permite determinar que *T. minuta* y *B. pilosa* translocan eficientemente el Pb absorbido por las raíces a la parte aérea, lo cual es coherente con la Figura 8.7.

Tabla 8.4. Factor de translocación (FT) y Factor de Trasferencia Total (FTT) (Valores medios \pm desvío estándar) para *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* cuando crecen en suelos contaminados en Bouwer.

Sitio	<i>Tagetes minuta</i>		<i>Bidens pilosa</i>	
	FT (raíz-aéreo)	FTT (raíz-aéreo)	FT (raíz-aéreo)	FTT (raíz-aéreo)
1	0,93 \pm 0,75	7,2 \pm 4,58	0,44 \pm 0,36	3,49 \pm 1,33
2	0,16 \pm 0,09	2,05 \pm 1,86	0,09 \pm 0,04	0,79 \pm 0,65
3	0,40 \pm 0,17	3,78 \pm 1,98	0,23 \pm 0,04	1,03 \pm 0,13
4	0,39 \pm 0,1	2,28 \pm 1,06	0,46 \pm 0,17	6,23 \pm 2,79
5	0,15 \pm 0,03	1,04 \pm 0,07	0,17 \pm 0,12	1,19 \pm 0,82
6	0,39 \pm 0,16	3,17 \pm 0,79	0,52 \pm 0,42	3,52 \pm 4,45

8.4. Discusión

Al comparar todas las variables que tradicionalmente se estudian en suelos por su asociación con la movilidad del Pb en los mismos, su extracción y la translocación de éste en las plantas, cabría esperar que los sitios 2 y 5 sean los más favorables para la acumulación de Pb en plantas fitoextractoras. Los suelos de estos sitios presentaron menores valores de pH, elevada CE, mayor disponibilidad de Pb, y mayor diversidad de microorganismos. Más aún, si en una primera aproximación se analizan sólo los datos de suelo, pareciera que el contenido de Zn y Cu en estos no es fundamentalmente importante ya que no varía significativamente entre sitios o compartimentos. Sin embargo, el análisis de los tres metales en las plantas, mostró que las diferencias significativas en la concentración de Pb entre los sitios se repetían con la misma tendencia para Zn, y de manera inversa para Cu. Teniendo esto en cuenta, se realizaron regresiones lineales múltiples con todo el conjunto de datos (Tabla 8.5.).

Tabla 8.5. Regresiones lineales múltiples para la concentración de Pb en raíz, tallo y hoja para la extracción total de Pb por planta (ET Pb/pl) integrando los resultados obtenidos para *T. minuta* y *B. pilosa*.

	Modelo	R ²	N
Pb Raíz	$0,38^{***} Pb_{F1} + 0,07^{**} Pb_{F2}$	0,65 ^{***}	24
Pb Tallo	$85,51^{**} + 0,11^{***} Pb_{Raíz} + 0,35^{***} Zn_{Tallo} + 0,25^{*} Cu_{F1} - 12,82^{*}$ pH	0,89 ^{**}	24
Pb Hojas	$0,44^{***} Pb_{Tallo} - 0,01^{*} Pb_{F2} + 0,83^{**} Zn_{F2} - 0,2^{**} Cu_{Tallo}$	0,85 ^{**}	24
ET Pb/pl	$113,8^{*} + 0,22^{**} Pb_{F1} - 1,13^{*} Zn_{F3} - 0,3^{*} CE + 1,67^{*}$ $Zn_{Tallo} + 4,32^{*} Zn_{Raíz} - 2,76^{*} Cu_{Tallo} - 2,63^{**} Cu_{Raíz}$	0,69 ^{***}	24

Niveles de significancia: ns, no significativo, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001. El subíndice en el símbolo del metal indica la concentración del mismo en ese órgano. El subíndice F1, F2 o F3 en el símbolo de un metal indica la concentración del mismo en las fracciones 1, 2 o 3 del suelo respectivamente.

Los resultados muestran que la concentración de Pb en la raíz se relaciona de manera directa con el contenido de Pb en las fracciones 1 y 2 del suelo, siendo independiente de las concentraciones de otros metales o de las variables físico-químicas del suelo. Por otra parte, la concentración de Pb en los tallos fue directamente proporcional a la concentración de Pb en la raíz, a la concentración de Zn en el tallo, a la concentración de Cu en la fracción 1 del suelo, y a la acidez del mismo, lo que indica que la translocación de Pb desde la raíz al tallo está mediada por el contenido de otros metales, no solo en la planta sino también en el suelo. Además, la concentración de Pb en las hojas fue directamente proporcional a la concentración de Pb en tallos, y al contenido de Zn en la fracción 2 del suelo, mientras que es inversamente proporcional con la concentración de Pb en la fracción 2 del suelo y la concentración de Cu en tallos. Integrando lo citado, la extracción total de Pb por planta fue directamente proporcional al contenido del mismo en la fracción 1 del suelo y a la concentración de Zn en tallos y raíces, mientras que se vio reducida por el incremento en el contenido de Zn en la fracción 3 del suelo, la concentración de Cu en el tallo y las raíces, y la CE. Estos resultados sugieren que la presencia de Cu biodisponible en el suelo favorece la absorción de Pb por parte de las plantas, mientras que la presencia de Cu en los tejidos vegetales limita el proceso. En el caso del Zn, la tendencia es exactamente opuesta, altos niveles de Zn en el suelo dificultan la absorción de Pb, mientras que la incorporación de Zn

en la planta la favorece. Este es un hallazgo importante porque da una pista fundamental para resolver la ruta metabólica utilizada por las plantas para la absorción de Pb. Existe abundante conocimiento sobre los mecanismos utilizados en plantas para la captación de otros metales pesados de suelos contaminados, tales como Cd, Zn, Cu, Ni, entre otros (Clemens et al., 2002); pero la absorción de Pb todavía no está bien comprendida (Pourrut et al., 2011). Los hallazgos de este capítulo indican que el Zn juega un rol fundamental en la incorporación y translocación de Pb en las plantas, ingresando ambos metales juntos, mientras que Cu presenta con Pb un fenómeno de competencia en la absorción y translocación. De todas maneras, es importante destacar que en este caso, las concentraciones de Cu halladas en los órganos vegetales superaron los valores considerados como fitotóxicos, en la bibliografía, mientras que los de Zn estuvieron por debajo de los límites de toxicidad (Påhlsson, 1989).

La competencia entre Pb y otros cationes se ha señalado para Ca (Pourrut et al., 2008; Wang et al., 2007), pero para Cu existen evidencias contradictorias (Kabata Pendias y Pendias, 1984; Yoon et al., 2006). Más aún, los resultados obtenidos en esta tesis indican que la relación entre Zn, Cu y Pb es determinante no sólo para la etapa primera de absorción del Pb a nivel de la raíz, sino también para las siguientes de translocación y acumulación. Teniendo en cuenta que tanto Cu como Zn son micronutrientes, y por lo tanto todas las especies vegetales cuentan con mecanismos para la absorción de los mismos desde el suelo, el estudio de los mecanismos comunes que podrían involucrar al plomo, podría ser clave en el mejoramiento de la capacidad fitoextractora de este metal por algunas especies.

En relación con el análisis de las deficiencias detectadas en el cálculo y empleo del factor de bioconcentración (FBC) citado en la bibliografía como indicador de la eficiencia fitoextractora de una especie, consideramos que la propuesta de un factor de bioextracción (FBE) supera estas dificultades. Los resultados obtenidos para este factor y su comparación con el FBC (Tabla 8.3) muestran que *T. minuta* se comporta como una eficiente especie bioextractora de Pb en todos los sitios excepto el 5. Cabe destacar que esta especie presentaba en el sitio 4 uno de los FBC más bajos del estudio, mientras que al calcular el FBE se encuentra que en este sitio la eficiencia fue la más alta en términos de masa de plomo extraída por planta. Para *B. pilosa* se observa el mismo fenómeno que para *T. minuta*

en el sitio 4, y también puede destacarse que *B. pilosa* presentó una mayor eficiencia bioextractora de Pb que *T. minuta* en todos los sitios a excepción del 3. Con la finalidad de corroborar la eficiencia del FBE propuesto se realizaron análisis de regresiones curvas simples entre dicho factor y la concentración biodisponible de Pb en suelos (Figura 8.8. A), encontrándose coeficientes de correlación elevados para ambas especies: 0,85 para *T. minuta* y 0,61 para *B. pilosa*.

En la Figura 8.8. B, C y D se muestra la comparación de los FBE con los FBC calculados en las dos especies a partir de la concentración de Pb en suelos para las fracciones 1 y pseudototal, mediante análisis de regresiones curvas simples. En todas las regresiones los coeficientes R^2 fueron menores para los FBC que para los FBE. Esto comprueba que el FBE revela de manera más exacta y realista la capacidad fitoextractora de las plantas en relación a las concentraciones del metal en el suelo.

Figura 8.8. Relación entre los factores de bioextracción (FBE) y los factores de bioconcentración (FBC) con la concentración de Pb en suelos (Fracción 1 y pseudototal) para *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* cuando crecen en suelos contaminados en Bouwer, Córdoba. A) Regresión entre el FBE calculado con la fracción 1 y la concentración de Pb en la misma fracción. B) Regresión entre FBE calculado a partir de la fracción pseudototal y concentración de Pb en suelo en la misma fracción.

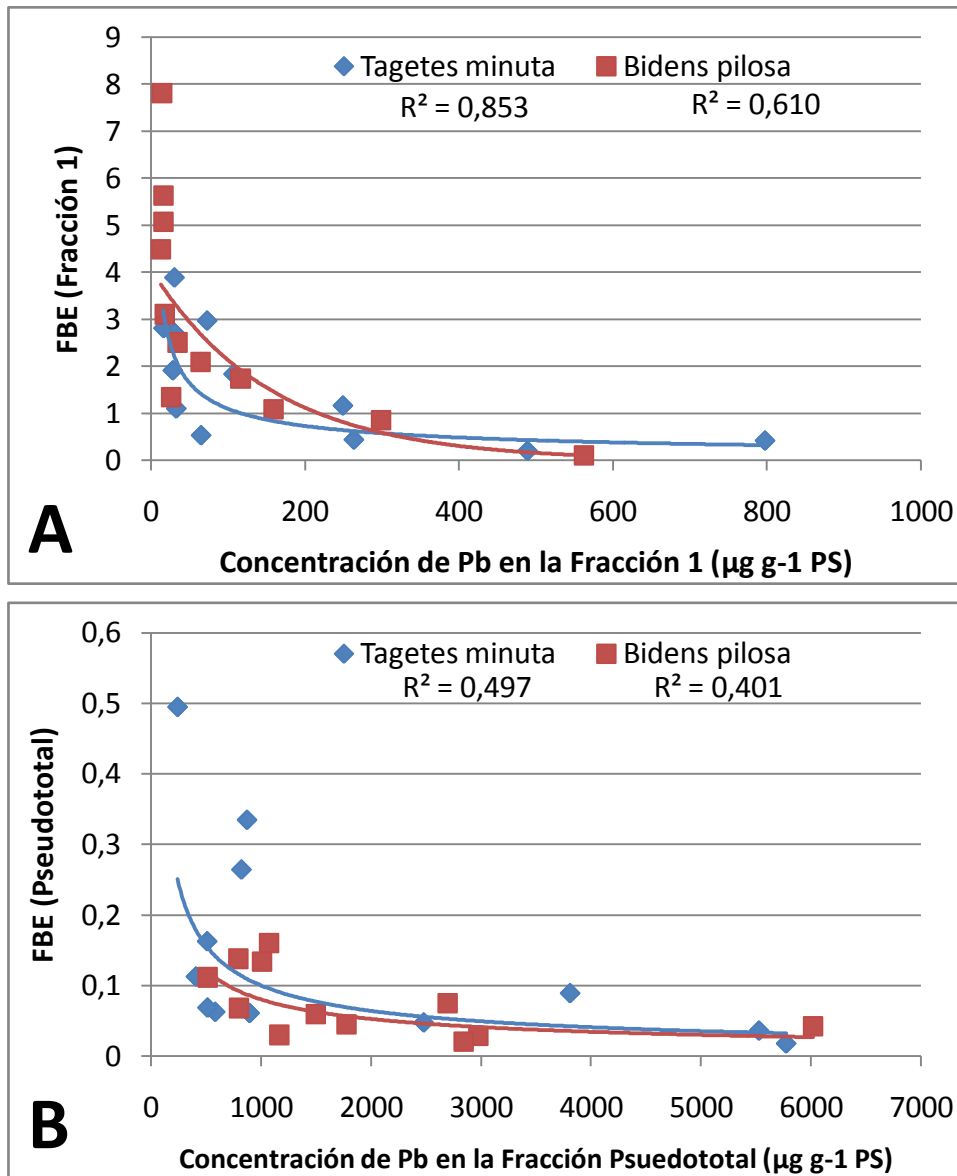
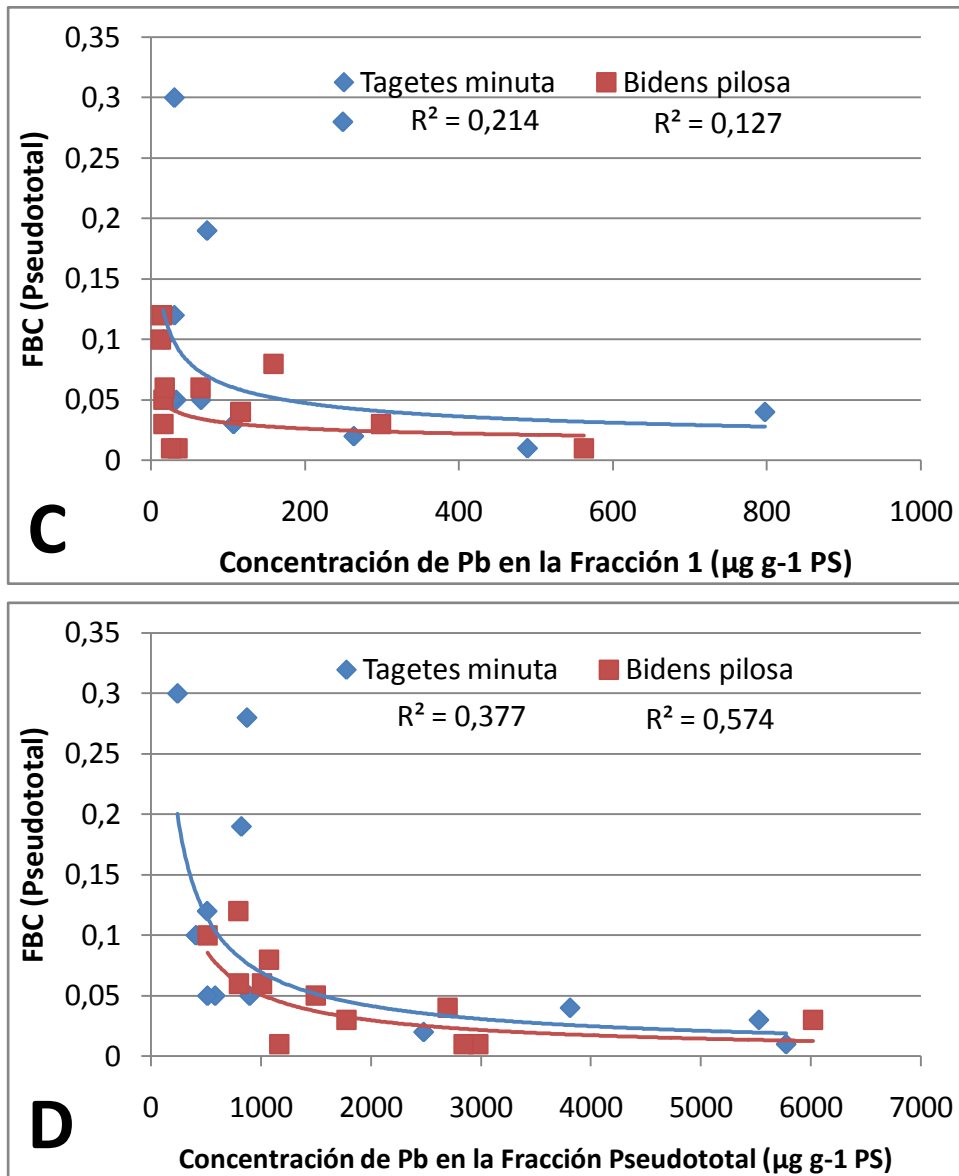


Figura 8.8. (Continuación). Relación entre los factores de bioextracción (FBE) y los factores de bioconcentración (FBC) con la concentración de Pb en suelos (Fracción 1 y pseudototal) para *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* cuando crecen en suelos contaminados en Bouwer, Córdoba. C) Regresión entre el FBC calculado con la fracción pseudototal y la concentración de Pb en la fracción 1 del suelo. B) Regresión entre FBC calculado a partir de la fracción pseudototal y concentración de Pb en suelo en la misma fracción.



8.5. Conclusiones

El presente estudio demostró que tanto la absorción de Pb por plantas de las especies *T. minuta* y *B. pilosa* que crecen en suelos contaminados con este metal, como su translocación a los tejidos aéreos, se relaciona no sólo con los parámetros físico-químicos que tradicionalmente se miden en suelos, sino de un modo aún más importante con el contenido de Zn y Cu en estos y en los órganos de estas especies. Los hallazgos de este capítulo indican que Zn es un metal necesario para incorporar y translocar Pb en las plantas, ingresando juntos ambos metales a éstas, mientras que Cu presenta fenómenos de competencia con Pb.

Por otro lado, el análisis de los factores tradicionalmente utilizados para definir la eficiencia fitoextractora de una especie cuando crece en suelos contaminados con metales pesados, mostró que estos presentan limitaciones y deficiencias. En relación a los resultados de este análisis, se proponen dos nuevos factores: un factor de transferencia total (FTT) que reemplazaría al factor de translocación (FT); y un factor de bioextracción (FBE) que proponemos sea empleado en lugar del factor de bioconcentración (FBC). Ambos han resultado ser más eficaces en la evaluación fitoextractora de las especies vegetales estudiadas en esta tesis. Los cálculos de los FBE muestran que las especies estudiadas decaen en eficiencia a medida que aumentan los niveles de Pb biodisponible en el suelo, siendo apropiadas para su empleo en fitorremediación de suelos con hasta 300 mg Pb kg⁻¹ PS en la fracción biodisponible (fracción 1, extracción secuencial), niveles que superan ampliamente los fijados por la legislación en relación a los valores máximos de Pb en la fracción pseudototal para suelos de uso agrícola o residencial.

Discusión

Esta tesis se desarrolló en el marco de una creciente preocupación por el grave problema ambiental que representa la contaminación de suelos agrícolas, en particular en la provincia de Córdoba, con plomo, un metal pesado con elevada toxicidad.

El desconocimiento de esta problemática y de sus consecuencias, por parte de los actores involucrados han llevado a que, hasta el momento, no se tomaran medidas tendientes a definir cuáles son las actividades que se están priorizando y se priorizarán en relación al uso del suelo cuando a partir de alguna de estas actividades se libera un tóxico, como lo es plomo, en suelos de uso agrícola. Preocupa también la falta de políticas ambientales tendientes a resguardar un recurso tan importante como son los suelos agrícolas, cuando existen resultados de investigaciones científicas que muestran concentraciones particularmente elevadas de plomo en semillas de cultivos que se producen en la provincia de Córdoba, entre estos soja (Salazar et al., 2012; Rodríguez et al., 2014).

El objetivo de esta tesis fue desarrollar y aportar conocimientos en el campo de la fitorremediación de suelos contaminados con plomo, con la finalidad de emplear esta metodología para el tratamiento de suelos de la Provincia de Córdoba, empleando especies nativas.

En este contexto, distintas especies vegetales han sido reportadas como eficientes fitoextractoras de Pb en otros países, por ejemplo: *Thlaspi* sp., maíz, girasol, *Minuartia verna* y *Brassica juncea*, entre otras (Blaylock et al., 1997; Clemente et al., 2005; Lim et al., 2004; Mukhopadhyay y Maiti, 2010; Vogel-Mikuš et al., 2005). No obstante, los suelos de la provincia de Córdoba que en estudios previos habían mostrado elevadas concentraciones de metales pesados, altos factores de enriquecimiento de Pb y aún la acumulación de éstos por los cultivos que allí crecían, no habían sido estudiados hasta el momento con la finalidad de evaluar la factibilidad de emplear métodos que permitieran llevar a cabo su remediación mediante el empleo de plantas (fitorremediación). Del mismo modo, tampoco existían antecedentes en la exploración de las capacidades fitoextractoras de Pb de especies vegetales nativas o silvestres presentes en Argentina.

Como área de estudio se seleccionó una zona en la localidad de Bouwer, Córdoba, Argentina, donde funcionó durante muchos años una fundición de plomo. Este sitio fue elegido, además, como banco de especies vegetales nativas una vez que se encontraron en suelos del área de estudio elevadas concentraciones de plomo. Las especies allí presentes fueron estudiadas en términos de su tolerancia a este contaminante y eficiencia en la acumulación-extracción del metal, con la finalidad de establecer si algunas de ellas podrían ser propuestas para su empleo en la fitorremediación de suelos contaminados por Pb, y en qué condiciones de cultivo.

Dada la falta de información previa sobre las características del suelo en el área de estudio y su grado de contaminación, en primer lugar se realizó un estudio de estos aspectos. Los resultados del mismo se expusieron en el Capítulo I y estos permitieron realizar la evaluación y selección de especies nativas y silvestres en los términos antes citados (Capítulo II). Para esto se realizaron experimentos en invernadero con las especies seleccionadas en el estudio a campo, *Tagetes minuta* L y *Bidens pilosa* L, los que tuvieron como objetivo establecer las condiciones que pueden mejorar las tasas de extracción por un lado, y por otro profundizar el conocimiento sobre la incorporación y translocación de Pb en especies vegetales, ya que para este metal esos aspectos no se conocen en profundidad, tal como sucede para otros metales, también tóxicos. En la evaluación a campo de estas variables (Capítulo VIII) en las especies estudiadas, el trabajo se enfocó en el análisis del comportamiento de las mismas en términos de tolerancia y acumulación de plomo en condiciones naturales, en sitios que presentaban elevados niveles de plomo y que habían sido empleados para uso agrícola e industrial. Los resultados de este estudio permitieron proponer nuevos factores que evalúan la eficiencia de especies vegetales con potencialidad para ser empleadas en la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados.

Las variables de respuesta de las plantas se estudiaron a lo largo de toda la tesis y fueron fundamentalmente las que permiten definir la eficacia y eficiencia de la extracción de plomo de suelos por plantas: crecimiento y biomasa producida, concentración del metal en los tejidos vegetales, el cálculo de factores de translocación, de bioconcentración, de transferencia del metal entre los distintos órganos y de bioextracción neta de Pb por planta.

A continuación se expone un análisis integrado de los resultados encontrados a lo largo de toda la tesis en el estudio de *T. minuta* y *B. pilosa*, en el contexto de su eficiencia y eficacia como fitoextractoras de Pb de suelos.

Crecimiento y Biomasa

Los parámetros utilizados para evaluar crecimiento vegetal fueron la altura de la planta y el número de nudos, medidos a lo largo del tiempo en los experimentos realizados en invernadero (Capítulos III y VII). Lo que difirió entre estos experimentos fue la forma en que se lograron distintas concentraciones de Pb en suelos. En uno de ellos el suelo fue enriquecido con Pb por adición de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, mientras que en el otro se emplearon suelos del área de estudio que presentaban un gradiente de concentración de Pb por el funcionamiento de la fundición del metal. En este último caso la aplicación de auxinas no produjo diferencias significativas en el crecimiento de las plantas cuando los suelos tenían altas concentraciones de plomo. La comparación entre los parámetros de crecimiento en *T. minuta* y *B. pilosa* ante los distintos tratamientos y gradientes de concentración del metal en suelos, mostró para *T. minuta* un crecimiento muy superior en altura (entre 60 y 80 cm) cuando el suelo empleado en los experimentos de invernadero con concentraciones crecientes de plomo era el obtenido de las inmediaciones de la fundición, en comparación con la altura que alcanzaron las plantas (entre 20 y 50 cm) cuando al suelo, también proveniente de Bouwer (mismo tipo de suelo, pero con bajas concentraciones de plomo), se había enriquecido con Pb en el laboratorio. El número de nudos en ambos casos fue entre 8 y 15, indicando que el desarrollo del tallo fue el parámetro más afectado en estos experimentos, y no el foliar. Para *B. pilosa*, la diferencia de altura entre las plantas para los dos experimentos no fue tan marcada, obteniéndose valores entre 60 y 100 cm para plantas que crecieron en suelos contaminados por la fundición y entre 50 y 80 cm para suelos enriquecidos con Pb en el laboratorio, los valores del número de nudos estuvieron entre 8 y 18; y entre 10 y 15 respectivamente. Ambas especies mostraron una mayor producción de biomasa cuando el suelo fue enriquecido artificialmente con Pb en el laboratorio, lo que puede estar relacionado con el aporte de nitrógeno dada la sal utilizada.

La bibliografía informa resultados de numerosos estudios en los que se han utilizado suelos provenientes de sitios contaminados (Braud et al., 2009; Lim et al., 2004; Murakami y Ae, 2009) y también otros en los que el suelo se enriquece con diversas sales de Pb o del metal que se estudie (Alexander et al., 2006; Evangelou et al., 2006; Sun et al., 2011; Zheljazkov et al., 2006); no obstante la elección parece ser siempre una decisión arbitraria puesto que no se discuten las ventajas y/o desventajas de un diseño o del otro. En esta tesis los resultados encontrados muestran que la respuesta en términos de crecimiento y biomasa producida son muy diferentes cuando el suelo se contamina artificialmente en el laboratorio, por lo cual para que los resultados sean comparables y, sobre todo, extrapolables a situaciones “reales” deberían utilizarse suelos contaminados con el metal de interés provenientes de los sitios “problema”.

Al margen del análisis de las metodologías experimentales tratadas en los párrafos anteriores, resulta de interés discutir los valores de biomasa obtenidos para cada especie a lo largo de la tesis. En los experimentos realizados en invernadero la producción de biomasa fue dependiente del tamaño de recipiente, maceta o rizobox con los que se trabajó, más que de los tratamientos aplicados en cada caso (Tabla D.1) En los experimentos descritos en los Capítulos III y VII se utilizaron bandejas amplias simulando parcelas (10 kg de suelo), en los del Capítulo IV se utilizaron rizobox (100 g de suelo), y en los demás experimentos se emplearon macetas individuales que contenían alrededor de 1,5 kg de suelo. El error que introducen los sistemas experimentales empleados en la evaluación de la producción de biomasa se comprueba cuando en los experimentos realizados a campo (masa de suelo indefinida) los valores máximos de biomasa en estas especies superaron varias veces los valores máximos obtenidos en los experimentos de invernadero para cada especie. Es decir que pese a las diferencias significativas encontradas dentro de cada diseño experimental, como tendencia general y en un análisis global, ninguno de los factores estudiados en los experimentos de laboratorio logró incrementar la biomasa de una manera eficiente. Estos resultados que revisten especial importancia, deben tenerse en cuenta en el diseño de experimentos mediante los cuales se pretenda evaluar el efecto de ciertos factores que se esperaría promuevan el crecimiento de las plantas. Posiblemente la presión ejercida sobre las plantas debido a la escasa disponibilidad de espacio oculte la respuesta del efecto de los tratamientos.

Tabla D.1. Valores mínimos y máximos de biomasa seca por órgano por planta obtenidos en los experimentos realizados a lo largo de la tesis.

		Biomasa Seca (g) Valor mínimo – Valor máximo							
Especie	Órgano	Experimentos realizados en los Capítulos							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
<i>Tagetes minuta</i>	Hoja	-	-	0,5-2	0,4-0,9	0,1-0,2	0,1-0,2	0,5-1	0,3-3
	Tallo	-	-	0,5-2		0,2-0,4	0,1-0,2	0,6-1,8	1-7
	Raíz	-	-	0,1-0,6	0,1-0,2	0,05-0,1	0,05-0,1	0,1-0,2	0,3-2
<i>Bidens pilosa</i>	Hoja	-	-	0,8-2,5	0,4-1	0,4-2	0,25-0,7	0,2-0,7	0,2-2
	Tallo	-	-	1,5-3,5		0,5-2	0,15-0,7	0,7-2	1,2-4
	Raíz	-	-	0,1-0,6	0,1-0,45	0,05-0,3	0,05-0,1	0,1-0,3	0,2-0,4

Concentración de Pb en Plantas y Extracción Neta

La extracción de Pb por *T. minuta* y *B. pilosa* osciló ampliamente, presentando desvíos estándar muy grandes en todos los experimentos. Esto hizo que fuera muy difícil atribuir las diferencias observadas a los factores estudiados en cada caso. No obstante fue evidente que algunos de estos tuvieron un fuerte efecto y aún fueron los responsables de esa elevada variabilidad, mientras que los tratamientos control permanecían con varianzas absolutas y relativas menores. Este comportamiento se vio reflejado en la heterocedasticidad encontrada repetidamente en los análisis estadísticos. Por otra parte, las grandes varianzas encontradas sugieren marcadas diferencias en el comportamiento de los individuos, éstos respondieron a los distintos tratamientos de manera muy disímil, tanto a las concentraciones crecientes de Pb en suelo como a la introducción de auxinas y biofertilizantes (Alexander et al., 2006).

En relación a la acumulación de Pb medida como concentración del metal ($\mu\text{g g}^{-1}$) en los distintos órganos de ambas especies, para todos los tratamientos los valores mínimos fueron encontrados, en general, en los tratamientos control y los valores máximos en plantas que crecían en suelos con elevadas concentraciones del metal (Tabla D.2.), pero también se encontraron valores altos de acumulación cuando se introdujeron factores que incidían en el crecimiento de las plantas. Si bien la comparación de medias no permitió obtener resultados certeros sobre el aumento en la eficiencia de extracción cuando se introducen cambios en las condiciones de cultivo, puede concluirse que la obtención de una línea de individuos de cada especie que responda de manera similar, permitiría analizar de

un modo más eficiente la tendencia de las máximas concentraciones de plomo encontradas en algunas plantas de cada especie ante los distintos tratamientos (Küpper et al., 2007; Meyer et al., 2010; Posthuma et al., 1993). El factor experimental que permitió comprender el mayor incremento en la acumulación de Pb en las dos especies fue el relacionado con la concentración y disponibilidad de Cu y Zn, metales esenciales para las plantas, datos expuestos en el Capítulo VI, localizándose este efecto principalmente en la raíz y el tallo. Los valores máximos de concentración de Pb en hojas, excepcionalmente elevados, que se encontraron en el estudio a campo (Capítulo II) no fueron observados en los experimentos de invernadero ni mediante alguna de las condiciones experimentales descritas. Esto permitiría inferir que las condiciones naturales de cultivo de las plantas a campo favorecen la translocación del metal.

Tabla D.2. Valores mínimos y máximos de concentración de Pb en cada órgano obtenidos a lo largo de la tesis.

		Concentración de Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$) Valor mínimo – Valor máximo							
Especie	Órgano	Capítulo							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
<i>Tagetes minuta</i>	Hoja	-	9-396	0,1-11,2	2,5-17	3-240	0-10	0-16	1-37
	Tallo	-	11-72	0,1-232		5-277	20-248	0-72	5-66
	Raíz	-	30-895	3-322	1-287	55-3000	115-2747	0-985	11-332
<i>Bidens pilosa</i>	Hoja	-	5,5-111	4-36	0,8-16	3-24	3-37	0-31	2-28
	Tallo	-	5,1-101	0,7-93		6-77	14-172	0-77	9-50
	Raíz	-	2,6-805	0,5-542	1-235	19-55	104-537	0-1316	28-263

En la bibliografía especializada sobre el estudio de la acumulación de metales pesados en especies vegetales aptas para su empleo en fitorremediación constan criterios, definidos por numerosos autores, que clasifican a las especies en hiperacumuladoras, acumuladoras y exclusotas. El criterio más ampliamente difundido, con el que acuerdan la mayoría de los especialistas, toma en cuenta una concentración de $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ PS de Pb en tejidos aéreos para identificar a esa especie como hiperacumuladora de este metal. Sin embargo, este criterio mínimo nominal se discute actualmente ya que el fijado no parece ser representativo para reconocer especies hiperacumuladoras. Van der Ent et al. (2013) propusieron dos criterios que permiten distinguir especies hiperacumuladoras:

(i) Una especie es hiperacumuladora cuando presenta concentraciones entre 2 y 3 órdenes de magnitud superiores a la mayoría de las plantas de otras especies que crecen en suelos no contaminados

(ii) Una especie es hiperacumuladora cuando presenta concentraciones al menos un orden de magnitud mayor que la mayoría de las plantas de otras especies cuando crecen en suelos metalíferos.

Adicionalmente, el hallazgo de un individuo que presente una elevada acumulación de un metal de modo tal que cumpla con el requisito tradicional ($1000 \mu\text{g g}^{-1}$ PS) o con alguno de los propuestos por Van der Ent et al. (2013), debe ser considerado un signo de hiperacumulación en esa especie, debido a que es síntoma de su adaptación hacia la tolerancia de un fitotóxico o ante factores tan adversos como son las elevadas concentraciones de ciertos metales pesados en suelos.

Más precisamente, para que una especie sea aceptada para su uso en la fitoextracción de un metal del suelo, es ideal que cumpla con el criterio tradicional de ser acumuladora de ese metal en órganos aéreos. Sin embargo, en la bibliografía puede observarse que esto rara vez se verifica para Pb, y en aquellos trabajos en los que se informa la capacidad de acumulación de este metal por alguna especie, los experimentos fueron realizados en condiciones de hidroponía o con especies que presentan escasa producción de biomasa (Liu et al., 2000; Piechalak et al., 2008). Estos resultados no deberían hacer elegible a una especie como fitoextractora para proyectos de fitorremediación de suelos contaminados con metales en condiciones de campo. Una de las pocas especies estudiadas en otros países como fitoextractora de plomo de suelos contaminados y que logra acumular concentraciones elevadas en órganos aéreos es *Brassica juncea* (Lim et al., 2004), pero su aplicación no es extensiva a todos los tipos de suelo (Clemente et al., 2005). De hecho cuando estudiamos esta especie en suelos de Bouwer enriquecidos con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Capítulo IV), los valores de concentración de Pb en órganos aéreos fueron similares (con máximos de $35 \mu\text{g Pb g}^{-1}$ PS), a los hallados en *T. minuta* ($25 \mu\text{g Pb g}^{-1}$ PS) y *B. pilosa* ($25 \mu\text{g Pb g}^{-1}$ PS). Por otra parte, *B. juncea* es una especie que presenta reducida biomasa, tanto radical como aérea, por lo cual en ella encontramos tasas de extracción neta de Pb por planta muy inferiores a las observadas en las especies nativas (máximas de $140 \mu\text{g Pb}$ para *B. pilosa*,

70 $\mu\text{g Pb}$ para *T. minuta*, y 35 $\mu\text{g Pb}$ para *B. juncea*). En definitiva, para los suelos estudiados en esta tesis, *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* fueron especies más eficientes en la extracción de Pb que la globalmente reconocida *Brassica juncea*.

El análisis de los resultados obtenidos a lo largo de la tesis muestra la importancia de integrar los datos de concentración del metal en los tejidos vegetales con los de biomasa producida, lo que permite calcular la eficiencia fitoextractora de cada especie en términos de tasa de extracción neta para el metal por planta. Esta indica la masa del metal que es extraído del suelo por planta y representa, por lo tanto, la eficacia de una especie para absorber, translocar y acumular en órganos aéreos un metal tóxico. El FBC, empleado hasta el momento, se calcula en base a los datos de concentración del metal en los distintos órganos, lo cual no es representativo de la cantidad de metal que es extraída del suelo. En la Tabla D.3. se muestran los valores mínimos y máximos de la extracción neta de Pb en los distintos órganos y el total por planta para *T. minuta* y *B. pilosa* encontrados a lo largo de la tesis.

Tabla D.3. Valores mínimos y máximos de extracción neta de Pb en cada órgano y planta completa obtenidos a lo largo de la tesis.

		Extracción de Pb por planta (μg) Valor mínimo – Valor máximo							
Especie	Órgano	Capítulo							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
<i>Tagetes minuta</i>	Hoja	-	-	1-18	1-13	0,3-25	0-1	0-12	5-84
	Tallo	-	-	2-111		0,5-59	4-23	0-46	19-160
	Raíz	-	-	0,2-35	0,1-61	2,5-122	4-73	0-75	4-195
	Total	-	-	7-158	1-71	4-133	8-97	1-111	35-339
<i>Bidens pilosa</i>	Hoja	-	-	2-21	0,5-15	0,5-18	0,4-17	0-9	0-29
	Tallo	-	-	1-198		1-75	3-26	0-51	10-158
	Raíz	-	-	0,1-151	0,2-136	0,6-133	1-90	0-313	7-92
	Total	-	-	11-289	1-147	4-205	7-125	1-374	35-255

Si se comparan los resultados de las Tablas D.2. y D.3. es un hecho notorio que elevados valores de concentración de Pb en raíces, resultados observados en los Capítulos V, VI y VII, fundamentalmente para *Tagetes minuta*, no se traduzcan en elevadas extracciones netas del metal del suelo. Algunos autores han reportado concentraciones elevadas de Pb en especies vegetales, incluso cumpliendo el criterio de hiperacumulación, sin proveer información sobre la cantidad de biomasa producida por planta (Liu et al.,

2000; Vogel-Mikuš et al., 2005), motivo por el cual no es posible calcular la eficiencia de las mismas como fitorremediadoras de suelos contaminados.

En la Tabla D.3. puede observarse que a lo largo de toda la tesis *B. pilosa* extrajo una mayor cantidad de Pb por planta que *T. minuta* durante los experimentos de invernadero; mientras que *T. minuta* fue más eficiente en el Capítulo VIII durante el estudio a campo.

Los resultados encontrados en esta tesis permitieron detectar algunas limitaciones en los criterios y factores citados en la bibliografía y que se usan para valorar a las diferentes especies como buenas o malas candidatas para su empleo en fitorremediación. Como factores superadores a los clásicos de Translocación (FT) y de Bioconcentración (FBC) se proponen, así, el Factor de Transferencia Total (FTT) y el Factor de Bioextracción (FBE), los cuales reflejan de una manera más fiel la relación entre la cantidad de Pb translocado a las distintas partes de la planta (FTT) y la eficiencia fitoextractora de cada especie en relación a la disponibilidad del metal en suelo (FBE). Para corroborar la aplicabilidad de estos nuevos factores, los mismos fueron calculados a partir de los resultados encontrados en los Capítulos III, IV, V, VI y VII y se exponen en las Tablas D.4., D.5., D.6., D.7. y D.8.

Tabla D.4. Comparación entre el factor de translocación (FT R-A) y factor de transferencia total (FTT R-A) de Pb desde la raíz a la parte aérea, y entre el factor de bioconcentración (FBC) y el factor de bioextracción (FBE) de Pb para los resultados obtenidos en el Capítulo III en el momento de cosecha final (98 días).

	FT R-A ± DS	FTT R-A ± DS	FBC ± DS	FBE ± DS
<i>Tagetes minuta</i>				
Tratamiento				
Control	1,0 ± 0,7	13,2 ± 13,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,6
300 ppm	0,3 ± 0,1	4,4 ± 0,9	0,069 ± 0,003	0,3 ± 0,1
600 ppm	0,2 ± 0,1	4,6 ± 0,2	0,06 ± 0,01	0,20 ± 0,03
1200 ppm	0,3 ± 0,1	6,9 ± 3,9	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,04
<i>Bidens pilosa</i>				
Tratamiento				
Control	0,5 ± 0,2	5,3 ± 0,9	0,6 ± 0,1	3,9 ± 1,1
300 ppm	0,3 ± 0,2	3,3 ± 2,1	0,07 ± 0,01	0,4 ± 0,2
600 ppm	0,3 ± 0,3	3,2 ± 3,5	0,03 ± 0,02	0,2 ± 0,1
1200 ppm	0,08 ± 0,02	2,6 ± 2,4	0,03 ± 0,01	0,08 ± 0,04

Por no contar con datos de la concentración de Pb en la Fracción 1 del suelo en estos experimentos, se utilizó la concentración de Pb alcanzada en el suelo mediante el agregado de Pb(NO₃)₂ en cada tratamiento teniendo en cuenta que los suelos de partida fueron los mismos en todos los casos.

Los resultados hallados para el FTT empleando los resultados obtenidos en el Capítulo III (Tabla D.4.) representan de un modo mejor que los FT, la translocación neta de Pb desde la raíz a la parte aérea de las plantas. En los experimentos realizados en el Capítulo III los cálculos para el FBE no pudieron realizarse de la manera propuesta en el Capítulo VIII, debido a que no se realizó extracción secuencial en suelos, es por ello los resultados del FBE no mejoran demasiado lo interpretado a partir del FBC.

Los resultados hallados para el FBE con los datos obtenidos en los experimentos del Capítulo IV (Tabla D.5.) representan mejor la eficiencia extractiva de cada especie, al expresarla como extracción neta de Pb por planta y también su translocación a órganos aéreos (FTT) que los resultados correspondientes al FT. Los resultados para los FT mostraban que, para el caso de *T. minuta*, la aplicación del biofertilizante Ab + Pf y el biofertilizante Pf aumentaban la translocación de Pb desde las raíces a la parte aérea, pero esto no ocurría cuando los suelos estaban enriquecidos con Pb. Los cálculos de los FTT permiten observar el efecto de los biofertilizantes mencionados también en suelos enriquecidos con Pb. Nuevamente, los cálculos para FBE no pudieron realizarse de la manera propuesta puesto que no se cuenta con los datos de extracción secuencial, es por ello que sus resultados no mejoran demasiado lo interpretado a partir del FBC.

Tabla D.5. Comparación entre el factor de translocación (FT R-A) y el factor de transferencia total (FTT R-A) de Pb desde la raíz a la parte aérea, y entre el factor de bioconcentración (FBC) y el factor de bioextracción (FBE) de Pb calculados con los resultados de los tratamientos homogéneos obtenidos en el Capítulo IV.

Biofertilizante	Suelo	FT R-A ± DS *	FTT R-A ± DS **	FBC ± DS n.s.	FBE ± DS n.s.
<i>Tagetes minuta</i>					
Control	Control	2,6 ± 1 b	19 ± 7 b	0,3 ± 0,1	0,11 ± 0,06
	300 ppm	0,06 ± 0,01 c	0,29 ± 0,02 d	0,021 ± 0,003	0,01 ± 0,01
	600 ppm	0,04 ± 0,02 c	0,13 ± 0,02 e	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Triple	Control	1,25 ± 0,7 b	7,35 ± 4,12 b	0,25 ± 0,15	0,16 ± 0,06
	300 ppm	0,05 ± 0,03 c	0,21 ± 0,09 d	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01
	600 ppm	0,03 ± 0,01 c	0,12 ± 0,09 e	0,014 ± 0,008	0,02 ± 0,01
Ab + Pf	Control	9,1 ± 4,7 a	41 ± 23 a	0,95 ± 0,31	0,55 ± 0,26
	300 ppm	0,11 ± 0,04 c	0,8 ± 0,3 c	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01
	600 ppm	0,07 ± 0,01 c	0,22 ± 0,02 d	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Ab	Control	2,1 ± 0,9 b	7,6 ± 3,1 b	0,41 ± 0,19	0,23 ± 0,11
	300 ppm	0,1 ± 0,03 c	0,42 ± 0,09 d	0,02 ± 0,01	0,023 ± 0,001
	600 ppm	0,05 ± 0,01 c	0,23 ± 0,06 d	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Pf	Control	4,3 ± 3,2 a	53 ± 32 a	0,43 ± 0,12	0,21 ± 0,13
	300 ppm	0,06 ± 0,04 c	0,25 ± 0,15 d	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
	600 ppm	0,09 ± 0,03 c	0,5 ± 0,2 c	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Biofertilizante	Suelo	FT R-A ± DS *	FTT R-A ± DS *	FBC ± DS	FBE ± DS
<i>Bidens pilosa</i>					
Control	Control	1,56 ± 0,44 b	2,11 ± 0,45 c	0,34 ± 0,10	0,14 ± 0,03
	300 ppm	0,04 ± 0,01 c	0,09 ± 0,01 d	0,023 ± 0,004	0,015 ± 0,001
	600 ppm	0,05 ± 0,01 c	0,09 ± 0,01 d	0,021 ± 0,003	0,017 ± 0,002
Triple	Control	7,1 ± 1,8 a	18,4 ± 2,1 a	0,7 ± 0,2	0,37 ± 0,04
	300 ppm	0,058 ± 0,004 c	0,12 ± 0,02 d	0,021 ± 0,001	0,017 ± 0,003
	600 ppm	0,07 ± 0,01 c	0,12 ± 0,01 d	0,026 ± 0,004	0,024 ± 0,003
Ab + Pf	Control	2,2 ± 0,4 b	4,8 ± 1,1 b	0,44 ± 0,08	0,24 ± 0,05
	300 ppm	0,05 ± 0,02 c	0,13 ± 0,03 d	0,03 ± 0,01	0,018 ± 0,004
	600 ppm	0,08 ± 0,01 c	0,134 ± 0,001 d	0,024 ± 0,002	0,023 ± 0,001
Ab	Control	1,3 ± 0,6 b	2,5 ± 1,1 c	0,13 ± 0,06	0,08 ± 0,03
	300 ppm	0,01 ± 0,01 c	0,02 ± 0,02 d	0,01 ± 0,01	0,004 ± 0,003
	600 ppm	0,07 ± 0,02 c	0,08 ± 0,02 d	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Pf	Control	1,1 ± 0,7 b	1,29 ± 0,56 c	0,22 ± 0,12	0,08 ± 0,01
	300 ppm	0,07 ± 0,02 c	0,26 ± 0,05 d	0,03 ± 0,01	0,018 ± 0,003
	600 ppm	0,12 ± 0,02 c	0,26 ± 0,05 d	0,024 ± 0,04	0,022 ± 0,004

Para calcular FBC y FBE, se utilizó la concentración de Pb alcanzada mediante el agregado de Pb(NO₃)₂ en cada tratamiento. ANOVA para la comparación de FT R-A y FTT R-A entre tratamientos (interacción entre factores). p<0,05 (*); p<0,01 (**). ns: no significativo.

Tabla D.6. Comparación entre el factor de translocación (FT R-A) y el factor de transferencia total (FTT R-A) de Pb desde la raíz a la parte aérea, y entre el factor de bioconcentración (FBC) y el factor de bioextracción (FBE) de Pb calculados a partir de los resultados obtenidos en el Capítulo V.

	FT R-A ± DS	FTT R-A ± DS	FBC ± DS	FBE ± DS
<i>Tagetes minuta</i>				
Tratamiento				
5	0,13 ± 0,04	0,96 ± 0,41	0,007 ± 0,003	0,018 ± 0,003
5+5	0,02 ± 0,01	0,09 ± 0,06	0,009 ± 0,005	0,03 ± 0,02
5+2	0,04 ± 0,03	0,52 ± 0,45	0,03 ± 0,01	0,09 ± 0,01
2	0,09 ± 0,05	0,54 ± 0,50	0,002 ± 0,001	0,003 ± 0,002
2+2	0,23 ± 0,02	1,03 ± 0,26	0,004 ± 0,001	0,010 ± 0,003
2+5	0,22 ± 0,17	0,78 ± 0,54	0,012 ± 0,007	0,02 ± 0,01
<i>Bidens pilosa</i>				
Tratamiento				
5	0,19 ± 0,12	2,64 ± 1,17	0,010 ± 0,001	0,07 ± 0,05
5+5	0,04 ± 0,02	0,65 ± 0,50	0,004 ± 0,002	0,12 ± 0,06
5+2	0,06 ± 0,04	0,62 ± 0,38	0,005 ± 0,002	0,16 ± 0,08
2	0,29 ± 0,18	4,36 ± 2,27	0,004 ± 0,002	0,02 ± 0,02
2+2	0,61 ± 0,45	11,3 ± 7,4	0,003 ± 0,001	0,02 ± 0,02
2+5	0,11 ± 0,06	1,71 ± 1,02	0,003 ± 0,001	0,05 ± 0,01

Para calcular FBC y FBE se utilizaron respectivamente las concentraciones promedio de la fracción pseudototal y de la fracción 1 determinadas en el Capítulo VIII para los sitios comunes en que fueron extraídos los suelos utilizados en el Capítulo V. Suelo 5: F1 = 280 µg Pb g⁻¹ PS; FPSt = 3300 µg Pb g⁻¹ PS; Suelo 2: F1 = 841 µg Pb g⁻¹ PS; FPSt = 5181 µg Pb g⁻¹ PS.

En el experimento de invernadero expuesto en el Capítulo V el efecto de la esterilización del suelo afectó las propiedades físico-químicas del suelo y esto no permitió evaluar de manera independiente el efecto del cruzamiento de los microorganismos provenientes de distintos suelos. Del mismo modo, este conflicto dificulta la interpretación de los resultados de los nuevos factores propuestos, ya que no se pueden valorar las hipótesis experimentales que permiten analizar si los FTT y FBE (Tabla D.6.) explican mejor que los tradicionales los resultados encontrados.

Tabla D.7. Comparación entre el factor de translocación (FT R-A) y el factor de transferencia total (FTT R-A) de Pb desde la raíz a la parte aérea, y entre el factor de bioconcentración (FBC) y el factor de bioextracción (FBE) de Pb calculados con los resultados obtenidos en el Capítulo VI.

	FT R-A ± DS	FTT R-A ± DS	FBC ± DS	FBE ± DS
<i>Tagetes minuta</i>				
Tratamiento				
Control	0,13 ± 0,04	0,96 ± 0,41	0,007 ± 0,003	0,018 ± 0,003
Cu	0,17 ± 0,11	1,14 ± 0,79	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,02
Zn	0,04 ± 0,01	0,39 ± 0,07	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,03
<i>Bidens pilosa</i>				
Tratamiento				
Control	0,19 ± 0,05	2,64 ± 0,37	0,010 ± 0,001	0,07 ± 0,05
Cu	0,096 ± 0,002	1,63 ± 0,86	0,004 ± 0,001	0,069 ± 0,006
Zn	0,21 ± 0,15	2,12 ± 0,12	0,013 ± 0,010	0,07 ± 0,05

Para calcular FBC y FBE se utilizaron respectivamente las concentraciones promedio de la fracción pseudototal y de la fracción 1 determinadas en el Capítulo VIII para los sitios comunes de los que fueron extraídos los suelos utilizados en el Capítulo VI. F1 = 280 µg Pb g⁻¹ PS; FPSt = 3300 µg Pb g⁻¹ PS.

Durante los ensayos expuestos en el Capítulo VI y los resultados de los FT calculados en esa instancia, podía observarse que en *B. pilosa* el agregado de Zn al suelo mantenía el FT de Pb constante, mientras que el agregado de Cu lo reducía significativamente. Cuando se calculan los FTT, puede apreciarse que el agregado de Zn al suelo reduce en cierta medida la translocación de Pb de raíces a la parte aérea. Estos resultados (FTT vs. FT) tienen mayor concordancia con los de extracción de Pb total por planta (Figura 6.4.), los que reflejan que el agregado de Zn al suelo provoca un mayor ingreso de Pb a la planta pero éste se acumula en la raíz sin translocar significativamente a los órganos aéreos. Esto muestra que el nuevo índice puede indicar tendencias que el FT no revelaba.

Tabla D.8. Comparación entre el factor de translocación (FT R-A) y el factor de transferencia total (FTT R-A) de Pb desde la raíz a la parte aérea, y entre el factor de bioconcentración (FBC) y el factor de bioextracción (FBE) de Pb para los resultados obtenidos en el Capítulo VII.

Auxinas	Suelo	FT R-A ± DS	FTT R-A ± DS	FBC ± DS	FBE ± DS
<i>Tagetes minuta</i>					
Sin	Control	1,18 ± 0,65	12,57 ± 4,62	0,70 ± 0,29	1,30 ± 0,47
	Media	0,27 ± 0,16	2,83 ± 1,82	0,01 ± 0,02	0,30 ± 0,37
	Alta	0,06 ± 0,02	0,71 ± 0,32	0,010 ± 0,002	0,13 ± 0,04
Con	Control	0,18 ± 0,05	2,25 ± 0,98	0,67 ± 0,41	1,79 ± 1,03
	Media	0,07 ± 0,01	0,61 ± 0,06	0,004 ± 0,000	0,055 ± 0,003
	Alta	0,05 ± 0,03	0,68 ± 0,39	0,011 ± 0,002	0,12 ± 0,04
<i>Bidens pilosa</i>					
Sin	Control	0,81 ± 0,36	5,61 ± 2,80	0,71 ± 0,53	0,99 ± 0,60
	Media	0,10 ± 0,03	0,57 ± 0,23	0,009 ± 0,004	0,12 ± 0,04
	Alta	0,05 ± 0,01	0,38 ± 0,06	0,014 ± 0,003	0,12 ± 0,02
Con	Control	0,13 ± 0,01	1,29 ± 0,32	0,19 ± 0,09	0,41 ± 0,15
	Media	0,10 ± 0,06	0,54 ± 0,25	0,010 ± 0,004	0,12 ± 0,08
	Alta	0,04 ± 0,01	0,27 ± 0,08	0,015 ± 0,002	0,14 ± 0,07

Para calcular FBC y FBE se utilizaron respectivamente las concentraciones promedio de la fracción pseudototal y de la fracción 1 determinadas en el Capítulo VIII para los sitios comunes donde fueron extraídos los suelos utilizados en el Capítulo VII. Alta: F1 = 280 µg Pb g⁻¹ PS; FPSt = 3300 µg Pb g⁻¹ PS; Media: F1 = 63 µg Pb g⁻¹ PS; FPSt = 867 µg Pb g⁻¹ PS; Control (Capítulo I): FPSt = 9,9 µg Pb g⁻¹ PS.

Los resultados discutidos en el Capítulo VII mostraban un mayor FT para la especie *T. minuta* en relación a *B. pilosa*. Si bien el FTT propuesto evidencia la misma tendencia, la diferencia entre las especies se hace más marcada. Otra tendencia que se percibe mejor mediante el uso del FTT en comparación al FT, es la debida a los tratamientos con aplicación de auxinas, en los cuales no se detectaba mediante el FT el decaimiento en la translocación de Pb en las plantas a medida que la concentración del metal aumentaba en suelo. Este patrón, claro a lo largo de toda la tesis, incluso en los tratamientos sin auxinas de ese mismo capítulo, se pone en evidencia cuando se calcula el FTT.

En cuanto a los FBC y FBE, puede decirse que en general el FBC adquiriría valores coherentes con lo esperado en términos de acumulación cuando las plantas crecían en suelos con bajas concentraciones de Pb, pero no arrojaba resultados que indicaran de un modo realista esta capacidad acumuladora cuando los suelos presentaban elevadas concentraciones del metal. Es importante destacar que en la comparación de los FBC y los

FBE los resultados son similares y se encuentran dentro del mismo orden de magnitud para los tratamientos control (Tablas D.4., D.5., D.6., D.7. y D.8), lo cual revelaría que ante la ausencia de estrés en plantas por elevadas concentraciones del metal ambos índices no difieren entre sí, mientras que cuando las plantas crecen en suelos con altas concentraciones de Pb el FBE permite detectar con más claridad los patrones de acumulación/extracción de Pb en plantas siendo sus resultados más representativos de la eficiencia fitoextractora de las distintas especies.

Para finalizar, puede decirse que la evaluación de los nuevos factores propuestos, realizada con los resultados de estudios llevados a cabo en condiciones experimentales de invernadero como a campo, revela que estos aportan una información más fidedigna en relación a la evaluación de la eficiencia extractiva de especies que puedan ser empleadas en fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados, que la que aportan los factores propuestos en la bibliografía.

Conclusiones

El primer estudio realizado en la provincia de Córdoba sobre la contaminación de los suelos aledaños a una fundición de plomo en Bouwer, mostró una grave situación con valores de concentración de plomo en suelos que superan ampliamente los fijados por la legislación nacional e internacional para todos los usos del suelo (agrícola, residencial e industrial). Más aún, los resultados evidenciaron que ese plomo se encuentra mayoritariamente en la fracción móvil o biodisponible en esos suelos.

Estos resultados advierten sobre la necesidad de intervención por parte de las autoridades provinciales para sanear el sitio y asegurar las condiciones mínimas propicias para la salud de los habitantes del lugar, como así también para asegurar la calidad de los alimentos que se producen en el sector (cultivos hortícolas, agrícolas y ganadería a pequeña escala). Por otro lado y desde el punto de vista científico, los resultados representan una contribución al estudio de la movilización de Pb, un tóxico importante, en suelos y su incorporación en la vegetación.

Mediante el estudio de las especies nativas y silvestres que crecen en el sitio de estudio, se demostró que dichas especies sufren una reducción de la capacidad natural de bioacumulación y de translocación del plomo cuando las concentraciones del metal en suelo son muy elevadas. Este fenómeno implica una respuesta de las plantas a la contaminación del suelo consistente en un cambio de estrategia desde la acumulación hacia la exclusión. Sin embargo, *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* conservaron la capacidad de acumular cantidades significativas de Pb en condiciones de alta contaminación de los suelos.

En los ensayos de tolerancia al Pb de estas especies, realizados con suelos locales enriquecidos con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, ambas mostraron una elevada adaptación a elevados niveles de Pb en suelos, con tiempos óptimos de cultivo de aproximadamente dos meses, a partir de los que cesa la acumulación del metal. Los resultados de los experimentos realizados en invernadero con agregado de plomo en forma de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ no arrojaron elevados factores de bioacumulación ni de translocación, los que tampoco se vieron afectados a lo largo del

tiempo ni en los diferentes niveles de exposición. En este caso, *Bidens pilosa* mostró mayor eficiencia fitoextractora de Pb que *Tagetes minuta*.

Cuando se estudió la respuesta de las especies seleccionadas a microorganismos promotores del crecimiento vegetal, se encontró que el comportamiento de las mismas fue disímil, en parte porque los efectos de estos interactúan fuertemente con las condiciones del suelo. Aun así, se pudo establecer que el empleo de *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens* potenció la tasa de extracción de Pb en *T. minuta* y la combinación de *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*, favorece la extracción de Pb en *Bidens pilosa* y *Brassica juncea*. Frente a la aplicación de biofertilizantes, *Bidens pilosa* fue la especie más eficiente como fitoextractora, superando ampliamente a la especie de referencia *Brassica juncea*.

El estudio del efecto de los microorganismos naturales presentes en los suelos contaminados de Bouwer sobre la extracción de Pb por parte de las especies elegidas mostró que estos actúan sobre las rutas de ingreso del contaminante a la planta, posiblemente participen en el entorno de la rizósfera facilitando o impidiendo el ingreso de metales esenciales a la planta. Este fenómeno podría ser común a Pb.

El sinergismo entre Pb y Zn, así como la competencia entre Pb y Cu, en la acumulación y translocación de Pb en las plantas fue un fenómeno detectado en distintas instancias de la tesis. Se demostró experimentalmente que el agregado de Zn al suelo puede lograr un incremento en la incorporación de Pb por *T. minuta*, aunque éste se aloja preponderantemente en la raíz.

En cuanto al uso de hormonas vegetales (auxinas), las especies estudiadas respondieron a su aplicación incrementando su desarrollo sólo cuando las mismas crecían en suelos con bajas concentraciones de plomo. Las tasas de extracción neta de Pb en general no variaron debido al uso de auxinas, aunque *B. pilosa* mostró mayores tasas de extracción cuando las plantas crecían en suelos altamente contaminados y se aplicaron estas hormonas (incremento localizado fundamentalmente en la raíz). Por otra parte, se encontró que las raíces de *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* producen exudados capaces de extraer Pb de suelos altamente contaminados. Pese a que el uso de auxinas no modificó la extracción de Pb por parte de las plantas, sí afectó la producción de exudados de las mismas. Este efecto

no fue homogéneo en todos los individuos, observándose una gran variabilidad en la respuesta.

Mediante el estudio a campo de las distintas condiciones evaluadas experimentalmente, se concluye que la disponibilidad de Pb en suelos contaminados, su acumulación y su translocación a los tejidos aéreos en las dos especies estudiadas se relacionaron no sólo con los parámetros físico-químicos del suelo, sino también y con mayor dependencia, lo que es importante resaltar, con la concentración de Zn y Cu en los órganos vegetales y con la fracción del suelo a la que estos metales están asociados. El Zn mostró ser un elemento necesario en la absorción y translocación de Pb en las plantas, ingresando juntos; mientras que el Cu presentó fenómenos de competencia limitando la captación de Pb cuando sus concentraciones en suelos eran mayores.

Al integrar los resultados de los distintos estudios realizados a lo largo de la tesis, puede concluirse que *Tagetes minuta* y *Bidens pilosa* fueron más eficientes en la extracción de Pb de los suelos contaminados provenientes de la localidad de Bouwer, que la especie globalmente reconocida como fitoextractora *Brassica juncea*. Los valores más elevados de extracción total de Pb por planta se encontraron en los estudios a campo, lo cual es un buen indicio para el uso de estas especies en la fitorremediación de suelos, ya que se comportan mejor en situaciones reales que en experimentales. Como se expuso anteriormente en la tesis, es ventajoso utilizar especies nativas para fitorremediar sitios contaminados, es por ello que resulta importante mencionar la distribución fitogeográfica natural de las especies estudiadas. La distribución de *Tagetes minuta* L. incluye Argentina (provincias de Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Distrito Federal, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Misiones, Salta, Santiago del Estero, Santa Fe, San Juan, San Luis y Tucumán); Brasil (estados de Paraná, Río Grande do Sul y Santa Catarina); Chile(Regiones I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y Región Metropolitana de Santiago); Paraguay (departamentos de Alto Paraguay, Amambay, Cordillera, y Presidente Hayes); y Uruguay (departamentos de Colonia, Lavalleja, Montevideo, y Tacuarembó) (IBODA 2014). La distribución de *Bidens pilosa* L. incluye Argentina (provincias de Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Sgo. del Estero y Tucumán); Brasil (estados Cainguas, Guaraní, Iguazú, San Martín); Chile (Archipiélago Juan Fernández); Paraguay (departamentos de Caaguazú, Central, Cordillera,

Guairá, Paraguarí); Uruguay (departamentos de Canelones, Cerro Largo, Colonia, Lavalleja, Montevideo, Salto) (IBODA, 2014).

Por otro lado, el análisis de los factores tradicionalmente utilizados para definir la eficiencia fitoextractora de una especie cuando crece en suelos contaminados con metales pesados, mostró que estos presentan limitaciones y deficiencias. En relación a los resultados de este análisis, se proponen dos nuevos factores: un factor de transferencia total (FTT) que reemplazaría al factor de translocación (FT); y un factor de bioextracción (FBE) que proponemos sea empleado en lugar del factor de bioconcentración (FBC). Ambos han resultado ser más eficaces en la evaluación de la capacidad fitoextractora de las especies vegetales estudiadas en esta tesis que los citados en la bibliografía.

Finalmente, debido a la gran variabilidad de respuesta encontrada entre individuos de las dos especies sometidos al mismo tratamiento, sería recomendable realizar una selección de un linaje de semillas dentro de cada especie que presenten un eficiente desempeño como fitoextractoras de Pb. Los resultados obtenidos en esta tesis, así como la comparación entre estos y los presentados en la bibliografía, muestran la necesidad de ampliar el enfoque de las investigaciones en el campo de la fitorremediación. Así, proponemos integrar los datos de concentración con los de biomasa producida por cada especie vegetal con la finalidad de calcular tasas netas de extracción de un metal. Estas permitirían evaluar no solo la eficacia de cada especie en la acumulación del contaminante, sino su eficiencia extractiva en términos de masa del contaminante que extraen del suelo por cada ciclo de cultivo.

Bibliografía

- Abou-Shanab, R.A., Angle, J.S., Delorme, T.A., Chaney, R.L., van Berkum, P., Moawad, H., Ghanem, K., Ghazlan, H.A., 2003. Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. *New Phytol.* 158, 219–224.
- Adie, G.U., Osibanjo, O., 2009. Assessment of soil-pollution by slag from an automobile battery manufacturing plant in Nigeria. *African Journal of Environmental Science and Technology* 3, 12.
- Adriano, D., Wenzel, W., Vangronsveld, J., Bolan, N.S., 2004. Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma* 122, 121-142.
- Agemian, H., Chau, A., 1977. A study of different analytical extraction methods for nondetrital heavy metals in aquatic sediments. *Archives of environmental contamination and toxicology* 6, 69-82.
- Ahmed, M., Singh, V., Upadhyay, R., 2012. *Brassica* Rhizosphere-Microbe Interactions and Their Role in Phytoremediation. *The Plant Family Brassicaceae*, 139-152.
- Ahmed, F., 1996. The battery recycling loop: a European perspective. *Journal of Power Sources* 59, 5.
- Alexander, P., Alloway, B., Dourado, A., 2006. Genotypic variations in the accumulation of Cd, Cu, Pb and Zn exhibited by six commonly grown vegetables. *Environmental Pollution* 144, 736-745.
- Al-Khashman, O.A., Shawabkeh, R.A., 2006. Metals distribution in soils around the cement factory in southern Jordan. *Environmental Pollution* 140, 387-394.
- Alkorta, I., Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Amezcaga, I., Albizu, I., Garbisu, C., 2004. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 3, 20.
- Alloway, B.J.; Jackson, A.P. 1991. The behaviour of heavy metals in sewage sludge-amended soils. *The Science of the Total Environment*, 100, 151-176.

- Alvarez, P.J.J., Illman, W.A., 2006. Bioremediation and natural attenuation: process fundamentals and mathematical models. Wiley.
- Amat, A., 1983. Pharmacological research for major taxons of Bonaerenses Compositae. Acta Farm Bonaerenses 2, 23-36.
- Anderson, C.; Deram, A.; Petit, D.; Brooks, R.; Stewart, R.; Simcock, R. 2001. Induced hyperaccumulation: Metal movement and problems. En: Trace elements in soil bioavailability, flux, and transfer (eds I.K. Iskandar & M.B. Kirkham), pp. 63-76. Lewis publishers.
- Andrades, M.; Carral, P.; Martínez Villar, E.; Álvarez, A.; Alonso-Martirena, J.I. 2000. Contenido en metales pesados y calidad de suelos en cultivos frutales de La Rioja (España). Edafología, 7, 313-318.
- Andrews, S., Sutherland, R.A., 2004. Cu, Pb and Zn contamination in Nuuanu watershed, Oahu, Hawaii. Science of the total environment 324, 173-182.
- Angelova, V.; Ivanova, R.; Delibaltova, V.; Ivanov, K. 2004. Bioaccumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). Industrial Crops and Products, 19, 197-205.
- Antoun, H., Beauchamp, C.J., Goussard, N., Chabot, R., Lalande, R., 1998. Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). Plant and Soil 204, 57-67.
- Argentina, 1993. Reglamentación de la Ley Nacional 24051. Decreto Nacional N° 831.
- Arreghini, S., de Cabo, L., de Iorio, A.F., 2006. Phytoremediation of two types of sediment contaminated with Zn by *Schoenoplectus americanus*. International Journal of Phytoremediation 8, 223-232.
- Arshad, M.A.; Martin, S. 2002. Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems. Agriculture, Ecosystems and Environment, 88, 153-160.
- Austin, G., Brandvold, L., Hawley, J., Renault, J., 1993. Lead contamination at an old smelter site at Socorro, New Mexico: Part I: Particle size and depth of contamination. Mining engineering. 45, 389-395.

- Bäckström, M., Karlsson, S., Allard, B., 2004. Metal Leachability and Anthropogenic Signal in Roadside Soils Estimated from Sequential Extraction and Stable Lead Isotopes. *Environmental Monitoring and Assessment* 90, 135-160.
- Baker, A.J.M., 1981. Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of plant nutrition* 3, 643-654.
- Baltazar, C., Surisadai, O., 2012. Estudio de la absorción y transporte de Cu (II) en la planta micorrizada *Tagetes erecta* L. (cempasúchil): Implicaciones para la Fitorremediación.
- Barbafieri, M., Tassi, E., 2011. Brassinosteroids for phytoremediation application, Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone. Springer, pp. 403-437.
- Barceló, J.; Poschenrieder, Ch. 1992. Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. *Suelo y Planta*, 2, 345-361.
- Bashan, Y., 1986. Enhancement of wheat root colonization and plant development by *Azospirillum brasilense* Cd. following temporary depression of rhizosphere microflora. *Applied and environmental microbiology* 51, 1067-1071.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S., Hernandez, J.-P., 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil* 378, 1-33.
- Batish, D.R., Arora, K., Singh, H.P., Kohli, R.K., 2007. Potential utilization of dried powder of *Tagetes minuta* as a natural herbicide for managing rice weeds. *Crop Protection* 26, 566-571.
- Becerril Soto, J.M., Barrutia Sarasua, O., García Plazaola, J.I., Hernández, A., Olano Mendoza, J.M., Garbisu Crespo, C., 2007. Especies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación.
- Bech, J., Duran, P., Roca, N., Poma, W., Sánchez, I., Roca-Pérez, L., Boluda, R., Barceló, J., Poschenrieder, C., 2012. Accumulation of Pb and Zn in *Bidens triplinervia* and *Senecio* sp. spontaneous species from mine spoils in Peru and their potential use in phytoremediation. *Journal of Geochemical Exploration*.

- Bermudez, G., Jasan, R., Plá, R., Pignata, M.L., 2011. Heavy metal and trace element concentrations in wheat grains: assessment of potential non-carcinogenic health hazard through their consumption. *Journal of Hazardous Materials* 193, 264-271.
- Bermudez, G., Moreno, M., Invernizzi, R., Plá, R., Pignata, M.L., 2010a. Heavy metal pollution in topsoils near a cement plant: The role of organic matter and distance to the source to predict total and HCl-extracted heavy metal concentrations. *Chemosphere* 78, 375-381.
- Bermudez, G.M.A., Moreno, M., Invernizzi, R., Plá, R., Pignata, M.L., 2010b. Evaluating top soil trace element pollution in the vicinity of a cement plant and a former open-cast uranium mine in central Argentina. *Journal of Soils and Sediments* 10, 1308-1323.
- Bermudez, G., Rodriguez, J.H., Pignata, M.L., 2009. Comparison of the air pollution biomonitoring ability of three *Tillandsia* species and the lichen *Ramalina celastri* in Argentina. *Environmental Research* 109, 6-14.
- Bernal, M., Clemente, R., Vazquez, S., Walker, D., 2007. Aplicación de la fitorremediación a los suelos contaminados por metales pesados en Aznalcóllar. *Ecosistemas* 16, 68-81.
- Betancur, L.M.A., Mazo, K.I.M., Mendoza, A.J.S., 2005. Fitorremediación: la alternativa para absorber metales pesados de los biosólidos. *Revista Lasallista de Investigación*, 57-60.
- Blaylock, M.J., Huang, J.W., 2000. Phytoextraction of metals. *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean-up the environment*. New York, John Wiley & Sons, Inc, 53-70.
- Blaylock, M.J., Salt, D.E., Dushenkov, S., Zakharova, O., Gussman, C., Kapulnik, Y., Ensley, B.D., Raskin, I., 1997. Enhanced accumulation of Pb in indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environmental Science & Technology* 37, 6.
- Bonfranceschi, B.A., Flocco, C., Donati, E., 2009. Study of the heavy metal phytoextraction capacity of two forage species growing in an hydroponic environment. *Journal of Hazardous Materials* 165, 366-371.

- Brännvall, M.L., Bindler, R., Renberg, I., Emteryd, O., Bartnicki, J., Billström, K., 1999. The Medieval metal industry was the cradle of modern large-scale atmospheric lead pollution in northern Europe. *Environmental Science & Technology* 33, 4391-4395.
- Braud, A., Jézéquel, K., Bazot, S., Lebeau, T., 2009. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere* 74, 280-286.
- Brooks, R.R., Chambers, M.F., Nicks, L.J., and Robinson, B.H., 1998. Phytomining. *Trends. Plant and Science* 1: 359-362.
- Buffa, E.V., Ratto, S.E., 2005. Disponibilidad de Cinc, Cobre, Hierro y Manganeso extraíble con DTPA en suelo de Córdoba (Argentina) y variables edáficas que la condicionan. *Revista Ciencia del Suelo* 32, 107-114.
- Bu-Olayan, A.H., Thomas, B.V., 2009. Translocation and bioaccumulation of trace metals in desert plants of Kuwait governorates. *Research Journal of Environmental Sciences* 3, 581-587.
- Bushnell, P., Jaeger, R., 1986. Hazards to health from environmental lead exposure: a review of recent literature. *Vet. Hum. Toxicol.* 3.
- Cala, V., Kunimine, Y., 2003. Distribución de plomo en suelos contaminados en el entorno de una planta de reciclaje de baterías ácidas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental.* 19, 7.
- Cancès, B., Juillot, F., Morin, G., Laperche, V., Polya, D., Vaughan, D., Hazemann, J.-L., Proux, O., Brown Jr, G., Calas, G., 2008. Changes in arsenic speciation through a contaminated soil profile: A XAS based study. *Science of the total environment* 397, 178-189.
- Cao, X., Ma, L.Q., Chen, M., Hardison, D.W., Harris, W.G., 2003. Weathering of lead bullets and their environmental effects at outdoor shooting ranges. *Journal of Environmental Quality* 32, 526-534.
- CCME, C.C.o.M.o.t.E., 1991. Canadian legislation.

- CCME, C.C.o.M.o.t.E., 2007. Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life: Summary tables, updated in: Canadian Environmental Quality Guidelines (1999), in: CCME, W. (Ed.).
- Clemens, S., Palmgren, M.G., Krämer, U., 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in plant science* 7, 309-315.
- Clemente, R., Walker, D.J., Bernal, M.P., 2005. Uptake of heavy metals and As by *Brassica juncea* grown in a contaminated soil in Aznalcóllar (Spain): The effect of soil amendments. *Environmental Pollution* 138, 46-58.
- Chen, T.B., Zheng, Y.M., Lei, M., Huang, Z.C., Wu, H.T., Chen, H., Fan, K.K., Yu, K., Wu, X., Tian, Q.Z., 2005. Assessment of heavy metal pollution in surface soils of urban parks in Beijing, China. *Chemosphere* 60, 542-551.
- Cheng, S., 2003. Heavy metal pollution in China: origin, pattern and control. *Environmental Science and Pollution Research* 10, 192-198.
- Chojnacka, K.; Chojnacki, A.; Górecka, H.; Górecki, H. 2005. Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants. *The Science of the Total Environment*, 337, 175-182.
- Comuna de Bouwer, 2008. Protocolo base presentado por la Comuna de Bouwer a la Secretaría de Ambiente de la Provincia de Córdoba. 2008.
- Condron, L.M.; Cameron, K.C.; Di, H.J.; Clough, T.J.; Forbes, E.A.; McLaren, R.G.; Silva, R.G. 2000. A comparison of soil and environmental quality under organic and conventional farming systems in New Zealand. *New Zealand of Agricultural Research*, 43, 443-466.
- Costello, C., 2003. Acid mine drainage: Innovative treatment technologies. National Network of Environmental Studies Fellows. US Environmental Protection Agency: Washington, DC.
- Crowley, D.E., Wang, Y.C. , Reid, C.P.P., Szaniszló, P.J., 1991. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants, *Plant Soil* 130,179–198.

- Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang, J.W., 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in biotechnology* 13, 393-397.
- Dahmani-Muller, H., Van Oort, F., Gelie, B., Balabane, M., 2000. Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution* 109, 231-238.
- Damiano, F., Taboada, M., 2000. Predicción del agua disponible usando funciones de pedo-transferencia en suelos agrícolas de la región pampeana. *Ciencia del Suelo* 18, 77-88.
- Danh, L.T., Truong, P., Mammucari, R., Foster, N., 2010. Economic Incentive for Applying Vetiver Grass to Remediate Lead, Copper and Zinc Contaminated Soils. *International Journal of Phytoremediation* 13, 47-60.
- Demergasso, C.S., Galleguillos P, P.A., Escudero G, L.V., Zepeda A, V.J., Castillo, D., Casamayor, E.O., 2005. Molecular characterization of microbial populations in a low-grade copper ore bioleaching test heap. *Hydrometallurgy* 80, 241-253.
- Dermatas, D., Meng, X., 2003. Utilization of fly ash for stabilization/solidification of heavy metal contaminated soils. *Engineering Geology* 70, 377-394.
- Dermont, G., Bergeron, M., Mercier, G., Richer-Lafèche, M., 2008. Soil washing for metal removal: A review of physical/chemical technologies and field applications. *Journal of Hazardous Materials* 152, 1-31.
- De Temmerman, L., Vanongeval, L., Boon, W., Hoenig, M., Geypens, M., 2003. Heavy metal content of arable soils in northern Belgium. *Water, Air, & Soil Pollution* 148, 61-76.
- Dell'Amico, E., Cavalca, L., Andreoni, V., 2008. Improvement of Brassica napus growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. *Soil Biol. Biochem.* 40, 74-84.
- De la Rosa-Pérez, D.A., Teutli-Leán, M.M.M., Ramírez-Islas, M.E., 2007. Electrorremediación de los suelos contaminados, una revisión técnica para su aplicación en campo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental.* 23, 10.

- Dimkpa, C., Svatos, A., Merten, D., Buchel, G., Kothe, E., 2008. Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under nickel stress. *Can. J. Microbiol.* 54, 163–172.
- Dragović, S., Mihailović, N., Gajić, B., 2008. Heavy metals in soils: Distribution, relationship with soil characteristics and radionuclides and multivariate assessment of contamination sources. *Chemosphere* 72, 491-495.
- Du, R.-J., He, E.-K., Tang, Y.-T., Hu, P.-J., Ying, R.-R., Morel, J.-L., Qiu, R.-L., 2011. How phytohormone IAA and chelator EDTA affect lead uptake by Zn/Cd hyperaccumulator *Picris divaricata*. *International Journal of Phytoremediation* 13, 1024-1036.
- Eckel, W.P., Rabinowitz, M.B., Foster, G.D., 2002. Investigation of unrecognized former secondary lead smelting sites: confirmation by historical sources and elemental ratios in soil. *Environmental Pollution* 117, 7.
- EPA, U., 2012 (a). A Citizen's Guide to Excavation of Contaminated Soil, in: Response, O.o.S.W.a.E. (Ed.).
- EPA, U., 2012. A Citizen's Guide to Solidification and Stabilization, in: Response, O.o.S.W.a.E. (Ed.).
- EPA, U., 2007. Brownfields Road Map to Understanding Options for Site Investigation and Cleanup, in: Agency, U.S.E.P. (Ed.).
- EPA, U., 2000. Introduction to Phytoremediation, in: Development, N.R.M.R.L.O.o.R.a. (Ed.).
- EPA, U., 1989. Risk Assessment Guidance for Superfund. Volume I: Human Health Evaluation Manual (Part A). EPA/540/1-89/002). Office of Emergency and Remedial Response. US EPA., Washington DC.
- Ettler, V., Mihaljevic, M., Komárek, M., 2004. ICP-MS measurements of lead isotopic ratios in soils heavily contaminated by lead smelting: tracing the sources of pollution. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, 311-317.

- Evangelou, M.W., Ebel, M., Schaeffer, A., 2006. Evaluation of the effect of small organic acids on phytoextraction of Cu and Pb from soil with tobacco *Nicotiana tabacum*. *Chemosphere* 63, 996-1004.
- Fabietti, G., Biasioli, M., Barberis, R., Ajmone-Marsan, F., 2009. Soil contamination by organic and inorganic pollutants at the regional scale: the case of Piedmont, Italy. *Journal of Soils and Sediments* 10, 290-300.
- Faccinelli, A., Sacchi, E., Mallen, L., 2001. Multivariate statistical and GIS-based approach to identify heavy metal sources in soils. *Environmental Pollution* 114, 12.
- FAO – OMS, 2014. Normas más estrictas sobre el plomo en los preparados para lactantes y el arsénico en el arroz. En <http://www.fao.org/news/story/es/item/238803/icode/>.
- Ferreira, T., Rasband, W., 2011. *Image J, User Guide*.
- Fingerman, M., Nagabhushanam, R., 2005. *Bioremediation of aquatic and terrestrial ecosystems*. Science Publishers.
- Flocco, C., Lobalbo, A., Carranza, M., Bassi, M., Giulietti, A., Mac Cormack, W., 2002. Some physiological, microbial, and toxicological aspects of the removal of phenanthrene by hydroponic cultures of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *International Journal of Phytoremediation* 4, 169-186.
- Franco-Uría, A., López-Mateo, C., Roca, E., Fernández-Marcos, M.L., 2009. Source identification of heavy metals in pastureland by multivariate analysis in NW Spain. *Journal of Hazardous Materials* 165, 1008-1015.
- Freitas, E., Nascimento, C., Silva, W., 2013. Citric Acid-Assisted Phytoextraction of Lead in the Field: The Use of Soil Amendments. *Water, Air, & Soil Pollution* 225, 1-9.
- Freitas, E.V.d.S., do Nascimento, C.W.A., 2009. The use of NTA for lead phytoextraction from soil from a battery recycling site. *Journal of Hazardous Materials* 171, 833-837.
- Gaiero, D., Simonella, L., Gassó, S., Gili, S., Stein, A., Sosa, P., Becchio, R., Arce, J., Marelli, H., 2013. Ground/satellite observations and atmospheric modeling of dust storms originating in the high Puna-Altiplano deserts (South America): Implications for

- the interpretation of paleo-climatic archives. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*.
- Gallardo, J., Saavedra, J., Martin-Patino, T., Millan, A., 1987. Soil organic matter determination. *Communications in Soil Science & Plant Analysis* 18, 699-707.
- Gao, Y., Miao, C., Wang, Y., Xia, J., Zhou, P., 2011. Metal-resistant microorganisms and metal chelators synergistically enhance the phytoremediation efficiency of *Solanum nigrum* L. in Cd-and Pb-contaminated soil.
- Gao, Y., Zhou, P., Mao, L., Zhi, Y., Zhang, C., Shi, W., 2010. Effects of plant species coexistence on soil enzyme activities and soil microbial community structure under Cd and Pb combined pollution. *Journal of Environmental Sciences* 22, 1040-1048.
- Garbisu Crespo, C., Becerril Soto, J.M., Epelde, L., Alkorta Calvo, I., 2007. Bioindicadores de la calidad del suelo: herramienta metodológica para la evaluación de la eficacia de un proceso fitorremediador.
- Ghilarov, A.M., 1995. Vernadsky's Biosphere Concept: An Historical Perspective. *The Quarterly Review of Biology* 70, 193-203.
- Ghosh, M., Singh, S., 2005. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Applied Ecology and Environmental Res* 3, 1-18.
- Gil, A., Ghersa, C., Leicach, S., 2000. Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology* 28, 261-274.
- Gleba, D., Borisjuk, N.V., Borisjuk, L. G., Kneer, R., Poulev, A., Skarzhinskaya, M., Dushenkov, S., Logendra, S., Gleba, Y. Y., Raskin, I., 1999. Use of Plant root for phytoremediation and molecular farming. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 5973-5977.
- Gleeson, A.M., 2007. Phytoextraction of Lead from contaminated soil by *Panicum virgatum* L. (Switchgrass) and associated growth responses., Department of Biology. Queen's University, Ontario, p. 130.
- Gleeson, A.M., 2007. Phytoextraction of Lead from contaminated soil by *Panicum virgatum* L. (Switchgrass) and associated growth responses., Department of Biology. Queen's University, Ontario, p. 130.

- Gleyzes, C., Tellier, S., Astruc, M., 2002. Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments: a review of sequential extraction procedures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 21, 451-467.
- Gorgas, J., Tassile, J., 2003. Recursos Naturales de la Provincia de Córdoba. INTA, Córdoba.
- Hamilton, E.I. 1995. State of the art of trace element determinations in plant matrices: determination of the chemical elements in plant matrices, an overview. *The Science of the Total Environment*, 176, 3-14.
- Hernandez, L., Probst, A., Probst, J.L., Ulrich, E., 2003. Heavy metal distribution in some French forest soils: evidence for atmospheric contamination. *Science of the total environment* 312, 195-219.
- Himelblau, E., Amasino, R.M., 2001. Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of plant physiology* 158, 1317-1323.
- Huang, J., Cunningham, S., 1996. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist*, 75-84.
- IBODA, Instituto de Botánica Darwinion, CONICET ANCEF, 2014. Flora del Conosur, Catálogo de Plantas Vasculares. <http://www.darwin.edu.ar>
- Isoyama, M., Wada, S.-I., 2007. Remediation of Pb-contaminated soils by washing with hydrochloric acid and subsequent immobilization with calcite and allophanic soil. *Journal of Hazardous Materials* 143, 636-642.
- Jou, C. J. G. (2006). An efficient technology to treat heavy metal—lead—contaminated soil by microwave radiation. *Journal of environmental management*, 78(1), 1-4.
- Juwarkar, A.A., Yadav, S.K., Kumar, P., Singh, S.K., 2008. Effect of biosludge and biofertilizer amendment on growth of *Jatropha curcas* in heavy metal contaminated soils. *Environmental Monitoring and Assessment* 145, 7-15.
- Kabata-Pendias, A., Mukherjee, A.B., 2007. Trace elements from soil to human. Springer Verlag, Berlin

- Kabata-Pendias, A. 2004. Soil-plant transfer of trace elements an environmental issue. *Geoderma*, 122, 143-149.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace elements in soils and plants. CRC.
- Kabata Pendias, A., Pendias, H., 1984. Trace elements in soils and plants. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Karlen, D., Mausbach, M., Doran, J., Cline, R., Harris, R., Schuman, G., 1997. Soil quality: a concept, definition, and framework for evaluation.
- Kashem, M., Singh, B., 2001. Metal availability in contaminated soils: I. Effects of flooding and organic matter on changes in Eh, pH and solubility of Cd, Ni and Zn. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 61, 247-255.
- Ketterer, M.E., Lowry, J.H., Simon Jr, J., Humphries, K., Novotnak, M.P., 2001. Lead isotopic and chalcophile element compositions in the environment near a zinc smelting–secondary zinc recovery facility, Palmerton, Pennsylvania, USA. *Applied Geochemistry* 16, 207-229.
- Kidd, P., Barceló, J., Bernal, M.P., Navari-Izzo, F., Poschenrieder, C., Shilev, S., Clemente, R., Monterroso, C., 2009. Trace element behaviour at the root–soil interface: implications in phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany* 67, 243-259.
- Kim, C., Lee, Y., Ong, S.K., 2003. Factors affecting EDTA extraction of lead from lead-contaminated soils. *Chemosphere* 51, 845-853.
- Knight, B.P., Chaudri, A.M., McGrath, S.P., Giller, K.E., 1998. Determination of chemical availability of cadmium and zinc in soils using inert soil moisture samplers. *Environmental Pollution* 99, 293-298.
- Knox, A., Gamedainger, A., Adriano, D., Kolka, R., Kaplan, D., 1999. Sources and practices contributing to soil contamination. In: *Bioremediation of Contaminated Soils*, DC Adriano, J.-M. Bollag, WT Frankenberger, Jr., and RC Sims Eds.
- Koide, R.T., Li, M., 1989. Appropriate controls for vesicular–arbuscular mycorrhiza research. *New Phytologist* 111, 35-44.

- Komárek, M., Chrastný, V., Stíchová, J., 2007. Metal/metalloid contamination and isotopic composition of lead in edible mushrooms and forest soils originating from a smelting area. *Environment international* 33, 677-684.
- Krämer, U., 2005. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion in Biotechnology* 16, 133-141.
- Kumar Sharma, R., Agrawal, M., Marshall, F., 2007. Heavy metal contamination of soil and vegetables in suburban areas of Varanasi, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66, 258-266.
- Kuffner, M., Puschenreiter, M., Wieshammer, G., Gorfer, M., Sessitsch, A., 2008. Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil* 304, 35-44.
- Küpper, H., Parameswaran, A., Leitenmaier, B., Trtílek, M., Šetlík, I., 2007. Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* 175, 655-674.
- Lacasaña, M., Romieu, I., McConnell, R., 1996. El Problema de la Exposición al Plomo en América Latina y el Caribe, in: Salud, O.P.d.I. (Ed.), Metepec, Mexico.
- Landrigan, P.J., Schechter, C.B., Lipton, J.M., Fahs, M.C., Schwartz, J., 2002. Environmental pollutants and disease in American children: estimates of morbidity, mortality, and costs for lead poisoning, asthma, cancer, and developmental disabilities. *Environmental Health Perspectives* 110, 721.
- Lanphear, B.P., Dietrich, K., Auinger, P., Cox, C., 2000. Cognitive deficits associated with blood lead concentrations < 10 microg/dL in US children and adolescents. *Public Health Reports* 115, 521.
- Larcher, M., Rapior, S., Cleyet-Marel, J.-C., 2008. Bacteria from the rhizosphere and roots of *Brassica napus* influence its root growth promotion by *Phyllobacterium brassicacearum*. *Acta Botanica Gallica* 155, 355-366.
- Lassat, M. M., 2000. Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal. Interaction and assessment of pertinent agronomic issues, *J. Hazard. Sub. Res.* 2, 1–25.

- Lavado, R.S., Rodríguez, M., Alvarez, R., Taboada, M.A., Zubillaga, M.S., 2007. Transfer of potentially toxic elements from biosolid-treated soils to maize and wheat crops. *Agriculture, ecosystems & environment* 118, 312-318.
- La Voz del Interior, 2006. Noticias Ambientales de la Provincia de Córdoba. "Más intoxicados con plomo en Bouwer". Córdoba, 7 de Octubre de 2006
- Li, X., Thornton, I., 2001. Chemical partitioning of trace and major elements in soils contaminated by mining and smelting activities. *Applied Geochemistry* 16, 1693-1706.
- Lim, J.-M., Salido, A.L., J. Butcher, D., 2004. Phytoremediation of lead using Indian mustard (*Brassica juncea*) with EDTA and electrodisks. *Microchemical Journal* 76, 3-9.
- Liphadzi, M., Kirkham, M., Paulsen, G., 2006. Auxin-enhanced root growth for phytoremediation of sewage-sludge amended soil. *Environmental Technology* 27, 695-704.
- Liu, D., Jiang, W., Liu, C., Xin, C., Hou, W., 2000. Uptake and accumulation of lead by roots, hypocotyls and shoots of Indian mustard [*Brassica juncea* (L.)]. *Bioresource technology* 71, 273-277.
- Lobet, G., Pagès, L., Draye, X., 2011. A novel image-analysis toolbox enabling quantitative analysis of root system architecture. *Plant Physiology* 157, 29-39.
- Luo, Y., Rimmer, D.L., 1995. Zinc-copper interaction affecting plant growth on a metal-contaminated soil. *Environmental Pollution* 88, 79-83.
- Madrid, F., Biasioli, M., Ajmone-Marsan, F., 2008. Availability and bioaccessibility of metals in fine particles of some urban soils. *Archives of environmental contamination and toxicology* 55, 21-32.
- Martínez, C.E., Jacobson, A.R., McBride, M.B., 2003. Aging and temperature effects on DOC and elemental release from a metal contaminated soil. *Environmental Pollution* 122, 135-143.
- Martinez, C.E., McBride, M.B., 1998. Coprecipitates of Cd, Cu, Pb and Zn in iron oxides: solid phase transformation and metal solubility after aging and thermal treatment. *Clays and Clay minerals* 46, 537-545.

- McGrath, S.P., Zhao, F.J., Lombi, E., 2001. Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant and Soil* 232, 8.
- Meyer, C.L., Kostecka, A.A., Saumitou-Laprade, P., Créach, A., Castric, V., Pauwels, M., Frérot, H., 2010. Variability of zinc tolerance among and within populations of the pseudometallophyte species *Arabidopsis halleri* and possible role of directional selection. *New Phytologist* 185, 130-142.
- Mico, C., Recatala, L., Peris, M., Sanchez, J., 2006. Assessing heavy metal sources in agricultural soils of an European Mediterranean area by multivariate analysis. *Chemosphere* 65, 863-872.
- Middleton, E., Kandaswami, C., 1993. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer in: J.B., H. (Ed.), *The flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman and Hall, London, pp. 619-652.
- Mohammed, T.I., Chang-Yen, I., Bekele, I., 1996. Lead pollution in East Trinidad resulting from lead recycling and smelting activities. *Environmental Geochemistry and Health* 18, 123-128.
- Montes Botella, C., 2001. Condicionamientos ambientales de *Erica andevalensis* Cabezudo & Rivera: respuesta frente a metales pesados. *Agrónomos*.
- Morales Bonilla, C., Mauss, E.A., 1998. A Community-Initiated Study of Blood Lead Levels of Nicaraguan Children Living Near a Battery Factory. *American Journal of Public Health* 88, 3.
- Moutsatsou, A., Gregou, M., Matsas, D., Protonotarios, V., 2006. Washing as a remediation technology applicable in soils heavily polluted by mining–metallurgical activities. *Chemosphere* 63, 1632-1640.
- Mukhopadhyay, S., Maiti, S., 2010. Phytoremediation of metal mine waste. *Applied Ecology And Environmental Research* 8, 207-222.
- Mulligan, C., Yong, R., Gibbs, B., 2001. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology* 60, 193-207.

- Murakami, M., Ae, N., 2009. Potential for phytoextraction of copper, lead, and zinc by rice (*Oryza sativa* L.), soybean (*Glycine max* [L.] Merr.), and maize (*Zea mays* L.). *Journal of Hazardous Materials* 162, 1185-1192.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex 29 microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 30 polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59.
- Nadal, M., Mari, M., Schuhmacher, M., Domingo, J.L., 2009. Multi-compartmental environmental surveillance of a petrochemical area: Levels of micropollutants. *Environment international* 35, 227-235.
- Närhi, P., Räisänen, M.L., Sutinen, M.-L., Sutinen, R., 2012. Effect of tailings on wetland vegetation in Rautuvaara, a former iron-copper mining area in northern Finland. *Journal of Geochemical Exploration*.
- Navarro, A., 2009. Vitrificación solar de lodos de flotación de la zona minera de Sierra Almagrera (Almería).
- Nedwed, T., Clifford, D.A., 1997. A survey of lead battery recycling sites and soil remediation processes. *Waste Management* 17, 13.
- Nicholson, F., Smith, S., Alloway, B., Carlton-Smith, C., Chambers, B., 2006. Quantifying heavy metal inputs to agricultural soils in England and Wales. *Water and Environment Journal* 20, 87-95.
- Nicholson, F.A., Smith, S.R., Alloway, B.J., Carlton-Smith, C., Chambers, B.J., 2003. An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *Science of the total environment* 311, 205-219.
- Niu, Z., Sun, L., Sun, T., 2011. The Bioadsorption of Cadmium and Lead by Bacteria in Root Exudates Culture. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 20, 877-891.
- Ortega, A., González, J., Huerta, J.A., López, K., Cárdenas, Y., 2008. Fitorremediación. Usar plantas para limpiar suelos contaminados, Tertiomileni.

- Påhlsson, A.-M.B., 1989. Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. *Water, Air, and Soil Pollution* 47, 287-319.
- Palacios, H., Iribarren, I., Olalla, M.J., Cala, V., 2002. Lead poisoning of horses in the vicinity of a battery recycling plant. *The Science of the Total Environment* 290, 9.
- Paz-Ferreiro, J., Lu, H., Fu, S., Méndez, A., Gascó, G., 2013. Use of phytoremediation and biochar to remediate heavy metal polluted soils: a review. *Solid Earth Discussions* 5.
- Pazos, M., Sanroman, M., Cameselle, C., 2006. Improvement in electrokinetic remediation of heavy metal spiked kaolin with the polarity exchange technique. *Chemosphere* 62, 817-822.
- Peltola, P., Åström, M., 2003. Urban geochemistry: a multimedia and multielement survey of a small town in northern Europe. *Environmental Geochemistry and Health* 25, 23.
- Pérez, M., Urcelay, C., 2009. Differential growth response to arbuscular mycorrhizal fungi and plant density in two wild plants belonging to contrasting functional types. *Mycorrhiza* 19, 517-523.
- Phillips, M.J., Lim, S.S., 1998. Secondary lead production in Malaysia. *Journal of Power Sources* 73, 6.
- Pickering, W., 1986. Metal ion speciation—soils and sediments (a review). *Ore Geology Reviews* 1, 83-146.
- Piechalak, A., Malecka, A., Baralkiewicz, D., Tomaszewska, B., 2008. Lead uptake, toxicity and accumulation in *Phaseolus vulgaris* plants. *Biologia Plantarum* 52, 4.
- Posthuma, L., Hogervorst, R.F., Joosse, E.N., Van Straalen, N.M., 1993. Genetic variation and covariation for characteristics associated with cadmium tolerance in natural populations of the springtail *Orchesella cincta* (L.). *Evolution*, 619-631.
- Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P., Pinelli, E., 2011. Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 213. Springer, pp. 113-136.

- Pourrut, B., Perchet, G., Silvestre, J., Cecchi, M., Guiresse, M., Pinelli, E., 2008. Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. *Journal of plant physiology* 165, 571-579.
- Qian, J., Shan, X.-q., Wang, Z.-j., Tu, Q., 1996. Distribution and plant availability of heavy metals in different particle-size fractions of soil. *Science of the total environment* 187, 131-141.
- Raksasataya, M., Langdon, A., Kim, N., 1996. Assessment of the extent of lead redistribution during sequential extraction by two different methods. *Analytica Chimica Acta* 332, 1-14
- Ramírez, A.V., 2008. Exposición a plomo en trabajadores de fábricas informales de baterías. *Anales de la Facultad de Medicina* 69, 4.
- Rascio, N., Navari-Izzo, F., 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science* 180, 169-181.
- Rauret, G. 1998. Extraction procedures for the determination of heavy metals in contaminated soil and sediment. *Talanta*, 46, 449-455.
- Reed, B.E., Carriere, P.C., Moore, R., 1996. Flushing of a Pb (II) contaminated soil using HCl, EDTA, and CaCl₂. *Journal of Environmental Engineering* 122, 48-50.
- Rodríguez, J.A., Nanos, N., Grau, J.M., Gil, L., López-Arias, M., 2008. Multiscale analysis of heavy metal contents in Spanish agricultural topsoils. *Chemosphere* 70: 1085-1096.
- Rodriguez, L., Rincon, J., Asencio, I., Rodriguez-Castellanos, L., 2007. Capability of selected crop plants for shoot mercury accumulation from polluted soils: Phytoremediation perspectives. *International Journal of Phytoremediation* 9, 1-13.
- Ross, S.M.; Kaye, K.J. 1994. The meaning of metal toxicity in soilplant systems. En: *Toxic metals in soil-plant systems* (ed S.M. Ross), pp. 27-61. John Wiley & Sons, Chischester.
- Salazar, M.J., Pignata, M.L., 2014. Lead accumulation in plants grown in polluted soils. Screening of native species for phytoremediation. *Journal of Geochemical Exploration* 137, 29-36.

- Salazar, M.J., Rodriguez, J.H., Nieto, G.L., Pignata, M.L., 2012. Effects of heavy metal concentrations (Cd, Zn and Pb) in agricultural soils near different emission sources on quality, accumulation and food safety in soybean *Glycine max* (L.) Merrill. Journal of Hazardous Materials.
- Salido, L., Hasty, K.L., Lim, J.M., Butcher, D.J., 2003. Phytoremediation of Arsenic and Lead in Contaminated Soil Using Chinese Brake Ferns (*Pteris vittata*) and Indian Mustard (*Brassica juncea*). International Journal of Phytoremediation 5, 15.
- Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I., 1998. Phytoremediation. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular 49, 26.
- Sanabria, J.A., Argüello, G.L., 2011. Suelos enterrados en la Plataforma Basculada Ondulada (Plataforma Basculada Ondulada) en la región central de la Provincia de Córdoba, Argentina. Geociências (São Paulo) 30, 23-29.
- Sanders, T., Liu, Y., Buchner, V., Tchounwou, P.B., 2009. Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: a review. Reviews on environmental health 24, 15.
- Sauvé, S., Hendershot, W., Allen, H.E., 2000. Solid-Solution Partitioning of Metals in Contaminated Soils: Dependence on pH, Total Metal Burden, and Organic Matter. Environmental Science & Technology 34, 1125-1131.
- Seneviratne, S.I., Corti, T., Davin, E.L., Hirschi, M., Jaeger, E.B., Lehner, I., Orlowsky, B., Teuling, A.J., 2010. Investigating soil moisture–climate interactions in a changing climate: A review. Earth-Science Reviews 99, 125-161.
- Seregin, I., Ivanov, V., 1997. Histochemical investigation of cadmium and lead distribution in plants. Russian Journal of Plant Physiology 44, 791-796.
- Serrato Cruz, M.A., 2003. Aspectos del Cultivo de dos Especies de Tagetes Productoras de Aceites Esenciales. Naturaleza y Desarrollo 1, 8.
- Sosa, M., Reyes, B., Moreno, M., Mirando, S., Alcalá, J., Quintana, C., Puga, S., 2008. Evaluación de Impacto Ambiental en Suelo contaminado con Pb y Cd provocado por una empresa minera en la ciudad de Chihuahua. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales 4, 7.

- Soule, J., 1993. *Tagetes minuta*: A potential new herb from South America. Wiley, New York.
- Steele, M.C., Pichtel, J., 1998. Ex-situ remediation of a metal-contaminated superfund soil using selective extractants. *Journal of Environmental Engineering* 124, 639-645.
- Stein, A.F., Toselli, B.M., 1996. Street level air pollution in Córdoba City, Argentina. *Atmospheric Environment* 30, 3491-3495.
- Strawn, D.G., Sparks, D.L., 2000. Effects of soil organic matter on the kinetics and mechanisms of Pb (II) sorption and desorption in soil. *Soil Science Society of America Journal* 64, 144-156.
- Sun, Y., Zhou, Q., Xu, Y., Wang, L., Liang, X., 2011. Phytoremediation for co-contaminated soils of benzo[a]pyrene (B[a]P) and heavy metals using ornamental plant *Tagetes patula*. *Journal of Hazardous Materials* 186, 2075-2082.
- Sutherland, R.A., Tack, F.M.G., Ziegler, A.D., Bussen, J.O., 2004. Metal extraction from road-deposited sediments using nine partial decomposition procedures. *Applied Geochemistry* 19, 947-955.
- Sutherland, R.A., 2002. Comparison between non-residual Al, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn released by a three-step sequential extraction procedure and a dilute hydrochloric acid leach for soil and road deposited sediment. *Applied Geochemistry* 17, 13.
- Sutherland, R.A., Tolosa, C.A., 2001. Variation in total and extractable elements with distance from roads in an urban watershed, Honolulu, Hawaii. *Water, Air and Soil Pollution* 127, 24.
- Sutherland, R., Tack, F., Tolosa, C., Verloo, M., 2000. Operationally defined metal fractions in road deposited sediment, Honolulu, Hawaii. *Journal of Environmental Quality* 29, 1431-1439.
- Tangahu, B.V., Abdullah, S., Rozaimah, S., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., Mukhlisin, M., 2011. A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering* 2011.

- Tereschuk, M.L., Riera, M.V.Q., Castro, G.R., Abdala, L.R., 1997. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *Journal of Ethnopharmacology* 56, 6.
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical chemistry* 51, 844-851.
- Thurman, D.A. 1981. Mechanism of metal tolerance in higher plants. En: Effect of heavy metal pollution on plants. Volume 2. Metals in the environment (ed N.W. Lepp), pp. 239-249. Applied science publishers, Englewood, New Jersey.
- Tian, S., Lu, L., Yang, X., Huang, H., Brown, P., Labavitch, J., Liao, H., He, Z., 2011. The impact of EDTA on lead distribution and speciation in the accumulator *Sedum alfredii* by synchrotron X-ray investigation. *Environmental Pollution* 159, 782-788.
- Tong, S., von Schirnding, Y.E., Prapamontol, T., 2000. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bulletin of the World Health Organization* 78, 1068-1077.
- Torri, S.I., Zubillaga, M., Cusato, M., 2009. Potential of *Discaria americana* for metal stabilization on soils amended with biosolids and ash-spiked biosolids. *International Journal of Phytoremediation* 11, 187-199.
- Turner, A.P. 1994. The responses of plants to heavy metals. En: Toxic metals in soil-plant systems (ed S.M. Ross), pp. 153-187. Wiley, Chichester.
- Unión Europea (U.E.), 2014. Metales pesados. Revisión agosto 2014. Contenidos máximos en metales pesados en productos alimenticios, plomo (Pb).
- van der Ent, A., Baker, A.J., Reeves, R.D., Pollard, A.J., Schat, H., 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloids trace elements: Facts and fiction. *Plant and Soil* 362, 319-334.
- Verboom, W., Pate, J., 2006. Bioengineering of soil profiles in semiarid ecosystems: the 'phytotarium' concept. A review. *Plant and Soil* 289, 71-102.
- Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255, 571-586.

- Vogel-Mikuš, K., Drobne, D., Regvar, M., 2005. Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf.(Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. *Environmental Pollution* 133, 233-242.
- Wang, H.-h., Shan, X.-q., Wen, B., Owens, G., Fang, J., Zhang, S.-z., 2007. Effect of indole-3-acetic acid on lead accumulation in maize (*Zea mays* L.) seedlings and the relevant antioxidant response. *Environmental and Experimental Botany* 61, 246-253.
- Wang, Y., Chen, T., Yeh, K., & Shue, M. (2001). Stabilization of an elevated heavy metal contaminated site. *Journal of Hazardous Materials*, 88(1), 63-74.
- Wannaz, E.D., Carreras, H.A., Abril, G.A., Pignata, M.L., 2011. Maximum values of Ni²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺ in the biomonitor *Tillandsia capillaris* (Bromeliaceae): Relationship with cell membrane damage. *Environmental and Experimental Botany* 74, 296-301.
- Wasay, S., Barrington, S., Tokunaga, S., 2001. Organic acids for the in situ remediation of soils polluted by heavy metals: soil flushing in columns. *Water, Air, & Soil Pollution* 127, 301-314.
- Wei, J.L., Lai, H.Y., Chen, Z.S., 2012. Chelator effects on bioconcentration and translocation of cadmium by hyperaccumulators, *Tagetes patula* and *Impatiens walleriana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
- White, C., Wilkinson, S.C., Gadd, G.M., 1995. The Role of Microorganisms in Biosorption of Toxic Metals and Radionuclides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 24.
- Whiting, S.N., Leake, J.R., McGrath, S.P., Baker, A.J.M., 2000. Positive responses to Zn and Cd by roots of the Zn and Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* 145, 12.
- Wienhold, B., Andrews, S., Karlen, D., 2004. Soil quality: a review of the science and experiences in the USA. *Environmental Geochemistry and Health* 26, 89-95.
- Wopereis, M., Gascuel-Oudou, C., Bourrie, G., Soignet, G., 1988. Spatial variability of heavy metals in soil on a one-hectare scale. *Soil science* 146, 113-118.

- Wu, G., Kang, H., Zhang, X., Shao, H., Chu, L., Ruan, C., 2010. A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. *Journal of Hazardous Materials* 174, 1-8.
- Wunsch, P., Greilinger, C., Bieniek, D., Kettrup, A., 1996. Investigation of the binding of heavy metals in thermally treated residues from waste incineration. *Chemosphere* 32, 2211-2218.
- Yadav, S.K., Juwarkar, A.A., Kumar, G.P., Thawale, P.R., Singh, S.K., Chakrabarti, T., 2009. Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by *Jatropha curcas* L.: Impact of dairy sludge and biofertilizer. *Bioresource technology* 100, 4616-4622.
- Yoon, J., Cao, X., Zhou, Q., Ma, L.Q., 2006. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the total environment* 368, 456-464.
- Zeng, F., Alia, S., Zhanga, H., Ouyangb, Y., Qiua, B., Wua, F., Zhang, G., 2011. The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants. *Environmental Pollution* 159, 84-91.
- Zhao, F., Hamon, R.E., McLaughlin, M.J., 2001. Root exudates of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* do not enhance metal mobilization. *New Phytologist* 151, 613-620.
- Zheljazkov, V.D., Craker, L.E., Xing, B., 2006. Effects of Cd, Pb, and Cu on growth and essential oil contents in dill, peppermint, and basil. *Environmental and Experimental Botany* 58, 9-16.