

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS DE
BAJO PESO MOLECULAR EN LA BIODISPONIBILIDAD

DE Pb y Zn EN UN SISTEMA

USANDO *Brassica juncea*

Por

IVÁN ISRAEL CÁRDENAS LARA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Procesos Sustentables

Junio 2010

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1 INTRODUCCIÓN	13
1.1 Contaminación del Suelo por Metales Pesados.	14
1.1.1 Fuentes de Contaminación.	15
1.1.2 Efectos Toxicológicos en Seres Vivos.....	16
1.2 Estrategias de Remediación de Sitios Contaminados	18
1.2.1 Remediación <i>in situ</i>	19
1.3 Fitorremediación.	20
1.3.1 Técnicas de Fitorremediación.	21
1.3.2 Fitoextracción.....	22
1.4 Justificación.	29
1.5 Hipótesis.	29
1.6 Objetivos.....	29
1.6.1 Objetivo general	29
1.6.2 Objetivos específicos	30
2 Materiales y Métodos.	31
2.1 Equipos y Materiales Utilizados	31

2.2	Suelo.....	32
2.2.1	Muestreo	32
2.2.2	Preparación y Análisis de las Muestras de Suelo Colectadas.....	34
2.3	Pruebas Preliminares.....	44
2.3.1	Pruebas de Solubilidad de Metales Pesados Asistida por AOBPM44	
2.3.2	Pruebas de Adaptación y Tolerancia.....	47
2.3.3	Pruebas Indirectas de Degradación de AOBPM.	48
2.4	Pruebas Piloto de Fitoextracción.	49
2.4.1	Germinación y Cultivo de Plantas.	50
2.4.2	Experimento Bajo Condiciones Controladas.	51
2.4.3	Experimento en Campo.....	51
2.5	Control de Calidad de Datos.....	55
2.6	Análisis Estadístico.....	55
3	Resultados y Discusiones.	56
3.1	Suelo.....	56
3.1.1	Muestreo.	56
3.1.2	Análisis de las Muestras Colectadas.....	56
3.2	Pruebas Preliminares.....	61
3.2.1	Pruebas de Solubilidad de Metales Pesados por AOBPM.	62

3.2.2	Pruebas de Adaptación y Tolerancia.....	67
3.2.3	Pruebas Indirectas de Degradación de AOBPM.	73
3.3	Pruebas Piloto de Fitoextracción.	76
3.3.1	Germinación y Cultivo de Plantas de Mostaza.....	77
3.3.2	Experimento Bajo Condiciones Controladas.	78
3.3.3	Experimento en Campo.....	83
4	CONCLUSIONES.....	109
5	Bibliografía.....	112

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1.1 LMP de metales pesados en suelos (mg/kg).	15
Tabla 1.2 Principales efectos toxicológicos de metales pesados en los seres humanos.	17
Tabla 1.3 Técnicas de remediación de sitios contaminados.	20
Tabla 1.4 Técnicas de fitoremediación.	21
Tabla 1.5 Rangos de concentración de metales pesados encontrados en suelos contaminados.	22
Tabla 1.6 Criterios para considerar una planta como hiperacumuladora de metales (mg/kg base seca).	24
Tabla 2.1 Material y equipo utilizado en cada determinación y su localización.	31
Tabla 2.2 Parámetros fisicoquímicos analizados en el suelo estudiado y los métodos seguidos para su determinación.	35
Tabla 2.3 Corrección de lecturas.	37
Tabla 2.4 Concentración de los estándares para la calibración de los equipos.	43
Tabla 2.5 AOBPM y controles utilizados en las pruebas preliminares.	46
Tabla 2.6 Niveles de suelo contaminado acondicionado con Peat-moss para pruebas de adaptabilidad y tolerancia.	47

Tabla 3.1 Resultados de algunos parámetros fisicoquímicos del suelo del área de estudio.	56
Tabla 3.2 Análisis de textura.....	57
Tabla 3.3 Análisis de la Capacidad de Intercambio Catiónico.	60
Tabla 3.4 Concentración de metales totales en suelo.	61
Tabla 3.5 Producción de biomasa seca a los diferentes tratamientos de suelo de las 4 especies vegetales analizadas tras 4 semanas de cultivo.	67
Tabla 3.6 Concentración de Pb y Zn en las especies vegetales analizadas a 100% contaminación.....	70
Tabla 3.7 Pesos fresco y seco de las plantas obtenidas del experimento de fitoextracción bajo condiciones controladas en invernadero.....	78
Tabla 3.8 Concentración y contenido total de Pb y Zn en biomasa seca de Brassica juncea cultivadas en macetas tratadas con AOBPM. Factor de remediación (FR) y Factor de bioconcentración (FBC).....	80
Tabla 3.9 Peso fresco y seco de Brassica juncea por parcela útil (excluyendo parcelas inútiles) cultivadas en un suelo contaminado por Pb y Zn.....	85
Tabla 3.10 Concentración y contenido total de Pb y Zn en biomasa seca de Brassica juncea cultivadas en campo tratado con AOBPM. Factor de remediación (FR) y Factor de bioconcentración (FBC).....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 3.1 Fracción metálica soluble por los AOBPM a una concentración de 10 mmoles/kg.....	63
Figura 3.2 Fracción metálica soluble por los AOBPM a una concentración de 50 mmoles/kg.....	64
Figura 3.3 Efecto en la solubilidad de Pb y Zn en el suelo de estudio por la adición de los AOBPM a una concentración de 50 mmoles/kg.....	74
Figura 3.4 Efecto en la solubilidad de Pb y Zn en el suelo de estudio por la adición de los AOBPM a una concentración de 100 mmoles/kg.....	74
Figura 3.5 Proyección del tiempo de remediación de Zn en un suelo contaminado usando fitoextracción asistida por ácido cítrico a 50 mmoles/kg utilizando Brassica juncea, durante el ciclo invernal asumiendo 6 cosechas por año.....	97
Figura 3.6 Proyección del tiempo de remediación de Pb en un suelo contaminado usando fitoextracción asistida por ácido cítrico a 50 mmoles/kg utilizando Brassica juncea, durante el ciclo invernal asumiendo 6 cosechas por año.....	98

Figura 3.7 Proyección hipotética del tiempo de remediación para Zn en un suelo contaminado usando fitoextracción asistida por ácido cítrico a 50 mmoles/kg utilizando Zea mays y Brassica juncea rotando cultivos por temporada asumiendo 4 cosechas anuales de maíz y 6 de mostaza. 102

Figura 3.8 Proyección hipotética del tiempo de remediación para Zn en un suelo contaminado usando fitoextracción asistida por ácido cítrico a 50 mmoles/kg utilizando Zea mays y Brassica juncea rotando cultivos por temporada asumiendo 4 cosechas anuales de maíz y 6 de mostaza. 103

LISTA DE IMÁGENES

Imagen	Página
Imagen 1.1 Técnicas de remediación in situ de suelos contaminados con metales	19
Imagen 1.2 Esquematización de fitoextracción continua (FC).	23
Imagen 1.3 Esquematización de fitoextracción inducida químicamente (FIQ)..	25
Imagen 2.1 Muestreo del Triangulo-diamante-hexágono según Reetz.....	33
Imagen 2.2 Zonas de muestreo.	33
Imagen 2.3 Clases texturales de suelo.	36
Imagen 2.4 Ejemplo de una curva de calibración generada en una hoja de cálculo (Excel).....	44
Imagen 2.7 Limpieza del sitio para el montaje experimental. Antes y después de la limpieza.....	49
Imagen 2.8 Plantilla de unigel (1m ²) utilizada para la siembra en campo.	50
Imagen 2.5 Zona experimental para prueba piloto de fitoextracción.....	52
Imagen 2.6 Muestreo de las plantas de la prueba piloto en campo.	53

Imagen 3.1 Determinación de la clase textural de suelo correspondiente a la zona de muestreo 3.	58
Imagen 3.2 Equipo diseñado para la mezcla vertical.	63
Imagen 3.3 Plantas de mostaza tras 4 semanas posteriores a la siembra.	77
Imagen 3.4 Construcción de las parcelas y siembra de las plantas de mostaza en el sitio experimental.	83
Imagen 3.5 Parcelas experimentales al momento de aplicación del ácido cítrico y málico a una concentración de 50 y 100 mmoles/kg.....	84
Imagen 3.6 Momento de la cosecha de las plantas de mostaza (7 semanas después del trasplante).....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
LMP	Límite máximo permisible
UE	Unión Europea
ZMM	Zona metropolitana de Monterrey
N/D	No determinada
FIQ	Fitoextracción inducida químicamente
FC	Fitoextracción continúa
AOBPM	Ácido orgánicos de bajo peso molecular
IB	Instituto de Biotecnología
LICAA	Laboratorio de Investigación en Ciencias de Alimentos y Ambiental
LSO	Laboratorio de Síntesis Orgánica
LAI	Laboratorio de Análisis Instrumental
FA	Facultad de Agronomía
H	Humedad
MO	Materia orgánica

CC	Capacidad de Campo
CIC	Capacidad de intercambio catiónico
EAA	Espectroscopia de absorción atómica
ICP	Plasma acoplado inductivamente
HDS	Hojas de seguridad
FAR	Franco arcilloso
FR	Factor de remediación
FBC	Factor de bio-concentración
F	Franco
M-Q	Metal quelante
SI	Índice de saturación
DMS	Diferencia mínima significativa
PROFEPA	Procuraduría Federal de Protección al Ambiente
EPA	Agencia de Protección al Ambiente

CAPITULO I

1 INTRODUCCIÓN

La contaminación en la actualidad es una realidad, día tras día la cantidad de desechos generados por las actividades humanas aumenta de manera exponencial. El desmesurado incremento en el número de industrias ha potencializado la cantidad de contaminantes generados por sus actividades (**Qiao et al., 2010**). Algunos contaminantes producidos por las grandes industrias, en conjunto con el uso de pesticidas, fertilizantes y la deposición de emisiones de la quema de combustibles fósiles, incineradores municipales, residuos de compañías metalúrgicas, entre otros factores, han dado pie a un problema que ha llegado a considerarse de manera seria y alarmante en los últimos años: la contaminación del suelo, en específico por metales pesados (**Sun et al., 2001**).

La contaminación por metales pesados en el suelo se ha convertido en un tema prioritario alrededor del mundo ya que se ha demostrado su toxicidad para microorganismos, plantas y animales (**Cui et al., 2004, Chen et al., 2003**).

Debido a la existencia de una gran cantidad de sitios contaminados con metales pesados alrededor del mundo, los científicos ambientalistas se han dado a la tarea de desarrollar técnicas para la remediación de suelos contaminados. En la actualidad, las investigaciones se han enfocado principalmente sobre el desarrollo de técnicas de remediación *in situ* debido a que son tecnologías

menos costosas y ambientalmente menos destructivas ya que se realizan sin retirar el suelo contaminado del lugar (**Todd et al., 2004, Ulery et al., 2008, EPA 2000**).

1.1 Contaminación del Suelo por Metales Pesados.

La contaminación del suelo por metales pesados (definidos por Galiulin *et al.*, **2008** como un grupo de elementos químicos con masa molecular mayor a 50) ha aumentado la preocupación por el cuidado del medio ambiente y ha estimulado en gran medida la investigación encaminada a encontrar tecnologías menos costosas, poco destructivas y ambientalmente amigables.

Un gran problema de la contaminación del suelo por metales es la toxicidad que estos acarrearán al medio ambiente. Algunos de estos metales tienen un efecto adverso sobre las prácticas normales de agricultura, ya que pueden ingresar a la cadena alimenticia por cultivos comestibles pudiendo ser una importante fuente de intoxicación (**Cui et al., 2004, Chen et al., 2003**). Además, tienen el potencial de alcanzar los cuerpos de agua subterráneos debido a filtraciones y escorrentías afectando a los seres humanos (**Chen et al., 2000**).

La concentración de un metal en un sitio al estar por encima de ciertos valores establecidos (límites máximos permisibles (LMP)) es el principal criterio para poder considerar un sitio como tóxico para la salud. Existen organismos tanto nacionales como internacionales que marcan estos valores dependiendo de la toxicidad del metal. Los LMP son muy variados, dependiendo de la región y/o país. La Tabla 1.1 enlista los LMP de acuerdo a la legislación vigente en la

Unión Europea (**Directiva 86/278/EEC**), la regulación de los Estados Unidos de América (**EPA**) y en México (**PROY NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004**).

Tabla 1.1 LMP de metales pesados en suelos (mg/kg).

Metal	LMP México (mg/kg)		LMP Unión Europea (mg/kg)	LMP EUA (kg/ha)
	Suelo agrícola ó residencial	Suelo Industrial	Suelos cosechables	Capacidad de carga
Arsénico	22	260	N/D	41
Cadmio	37	450	3	39
Cobre	600	N/D	140	1500
Cromo VI	280	510	ND	N/D
Mercurio	23	310	1.5	300
Níquel	1,650	2000	N/D	18
Plomo	400	750	300	400
Zinc	1,500	N/D	300	2800

Fuente: Unión Europea (Directiva 86/278/EEC), Estados Unidos de América (EPA), México (PROY NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004). N/D: no determinado. Capacidad de carga: cantidad máxima tolerable por el suelo al que se le aplica un bio-sólido conteniendo metales pesados.

1.1.1 Fuentes de Contaminación.

Las fuentes de contaminación del suelo por metales pesados son variadas, dentro de las más importantes destacan los procesos de minería (**Chen et al., 2000**) en todas sus dimensiones, desde el proceso de extracción de metales del suelo hasta su refinado. Los principales metales contaminantes procedentes de plantas metalúrgicas son el plomo (Pb), níquel (Ni), arsénico (As), cadmio (Cd), cromo (Cr), hierro (Fe), zinc (Zn) y mercurio (Hg).

Una fuente igualmente importante de contaminación por Pb y Ni es la quema de combustibles fósiles tales como carbón, petróleo y sus derivados (**Cui et al., 2004, Chen et al., 2003**), ya que su combustión genera una pequeña cantidad

de metales volátiles (**Vehlow et al., 2003**) (*i.e.* fracción de un elemento que es transferida a la ceniza volante), que eventualmente se depositaran en el suelo.

El uso de pesticidas, en especial de los órgano-metálicos y fosfatados, también contribuyen a la contaminación por metales pesados en suelos (**Qiao et al., 2010**). Esta clase de pesticidas están constituidos por cadenas de carbono unidas a ciertos metales, (*e.g.* Pb, Zn, Hg) los cuales al ser aplicados en los cultivos llegan a caer al suelo y por acción del agua de riego se filtran en él ocasionando una acumulación del metal contaminante en el sitio (**Weigmann et al., 2009**)

La aplicación de biosólidos como fertilizantes en suelo con presencia de metales (**Jurado et al., 2004**) es otra fuente de contaminación significativa por la acumulación de metales en el suelo, que en los últimos años ha desarrollado una alta popularidad debido al afán de obtener una ganancia a partir de un material de desecho generado por el tratamiento de aguas residuales (**Fassler et al., 2010**).

Se sabe además, que la irrigación con agua de desechos puede contribuir de manera significativa a la contaminación del suelo por metales (**Qiao et al., 2010**). En general es posible encontrar suelos contaminados por metales en sitios con actividad industrial (**do Nascimento et al., 2006**).

1.1.2 Efectos Toxicológicos en Seres Vivos.

Un importante problema de la contaminación por metales pesados en suelos es la movilidad pueden presentar por procesos de filtración de aguas de lluvia o riego y que mediante lixiviación de metales pueden alcanzar las aguas

subterráneas contaminando mantos freáticos, lagos, ríos, etc. y de esta manera ingresar a la cadena de alimenticia (**Ulery et al., 2008**). Un problema asociado a esto se presenta debido a que algunas plantas pueden llegar a acumular metales del suelo contaminado creando así una nueva fuente de exposición por ingesta tanto para animales y humanos (**Cui et al., 2004; Chen et al., 2003**).

Estudios científicos han demostrado que los metales pesados pueden llegar a ocasionar serios problemas a la salud tanto de seres inferiores como en los humanos, así como la pérdida de vegetación en lugares contaminados (Tabla 1.2) (**Todd et al., 2004**).

Tabla 1.2 Principales efectos toxicológicos de metales pesados en los seres humanos.

Metal	Efecto Toxicológico
Arsénico	Alteraciones de la piel, lesiones dérmicas, vasculopatías periféricas, enfermedades respiratorias, neurológica, cardiovasculares y diversos tipos de cáncer.
Cadmio	Neumonitis química, edema pulmonar, vómitos, diarrea, dolor abdominal, lesiones renales, enfisemas, anemia hipocrómica, pérdida del sentido del olfato, cáncer pulmonar, muerte.
Cobre	Nausea, vómito, diarrea, sudoración, hemólisis intravascular, posible fallo renal, convulsiones, coma, muerte.
Cromo	Irritación o corrosión cutáneo-mucosa, reacciones cutáneas de tipo alérgico o ulceraciones de la piel, úlceras, dermatitis, rinorrea, lesiones del tabique nasal, enrojecimiento de la garganta, tos, cefalea, disnea, necrosis renal, necrosis hepática, hemorragia gastrointestinal, cáncer de pulmón.
Mercurio	Irritación pulmonar (neumonía química), edema pulmonar agudo, afección de la función renal, trastornos renales, digestivos, mentales y nerviosos.
Níquel	Alergias, rinitis, sinusitis, enfermedades respiratorias; cáncer de pulmón, cavidades nasales y otros órganos.
Plomo	Deficiencias neurológicas, problemas de fatiga y concentración, neuropatía periférica, parálisis, deficiencia en la producción de hemoglobina, impide la maduración celular y el desarrollo de huesos y dientes, hipertensión, aminoaciduria, glicosuria, abortos y muertes fetales, diferentes tipos de cánceres.
Zinc	Irritante gastrointestinal, fiebre, nausea, vómito, diarrea, úlceras cutáneas, erosión dental, ataques de escalofríos, fiebre irregular, sudoración profusa,

náuseas, sed, cefalea, dolores en las extremidades, sensación de extremo cansancio, edema pulmonar, bronconeumonía, muerte por fallas respiratorias.

Fuente: *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo (Nordberg, 2001)*.

La presencia de los metales pesados en suelos es realmente un problema severo debido a los efectos que tienen no solamente sobre la salud humana, sino de todos los organismos lo que ha dado pie a los científicos para desarrollar investigaciones enfocadas en la remediación de los sitios contaminados (**Galiulin et al., 2008**).

1.2 Estrategias de Remediación de Sitios Contaminados

El objetivo de las estrategias de remediación es disminuir la cantidad de metales presentes en el sitio hasta alcanzar valores por debajo de las regulaciones pertinentes. Estas técnicas se pueden clasificar dentro de dos grandes grupos: técnicas de remediación *in situ* y técnicas de remediación *ex situ* (**Todd et al., 2004**).

Las técnicas de remediación *ex situ* involucran remover la matriz contaminada, en este caso el suelo, del sitio originalmente contaminado para darle algún tratamiento y disminuir la cantidad de contaminantes o confinar el suelo. Sin embargo, estos tratamientos pueden ocasionar la pérdida de las propiedades del suelo dejándolo biológicamente inactivo (**Wieshammer et al., 2007**). El problema con este tipo de estrategias es el elevado costo que acarrea la movilización del suelo contaminado del sitio, ya sea para su tratamiento o confinamiento (**Ulery et al., 2008, EPA 2000**).

1.2.1 Remediación *in situ*.

Las investigaciones actuales se han enfocado en las técnicas de remediación *in situ*, las cuales tratan la contaminación de manera localizada, es decir, sin remover el suelo contaminado del sitio. Los principales objetivos de estas técnicas de remediación son: 1) disminuir la lixiviación de los metales evitando contaminaciones subsecuentes (**Sun et al., 2001, Cui et al., 2004, Chen et al., 2003**), 2) disminuir la biodisponibilidad de los metales para los humanos minimizando riesgos de exposición (**Todd et al., 2004**) y 3) restablecer la vegetación ya que los metales pueden impedir el crecimiento de las plantas y con esto se vería aumentada la dispersión eólica del contaminante (**Todd et al., 2004**).

Las diferentes técnicas de remediación de suelos contaminados se basan en tres diferentes estrategias: aislamiento, remoción y estabilización (Imagen 1.1) (**Todd et al., 2004**).

Imagen 1.1 Técnicas de remediación in situ de suelos contaminados con metales (Modificado de Todd et al., 2004).

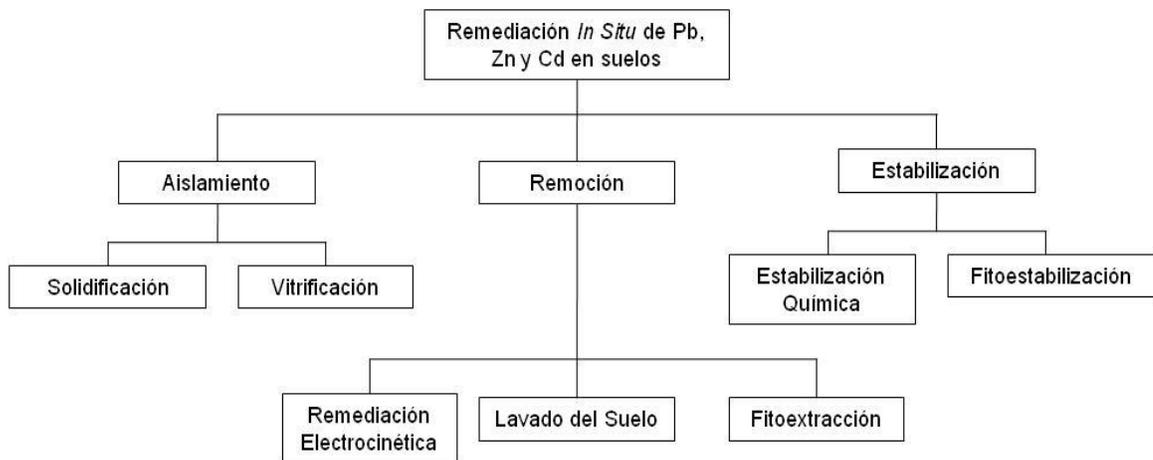


Tabla 1.3 Técnicas de remediación de sitios contaminados.

Técnica	Aplicación	Fundamento	Costo
Aislamiento	Solidificación / Estabilización	Aplicación de agentes (e.g. cementantes) que se unan a la matriz del suelo junto con el metal encapsulándolo y reduciendo la permeabilidad del suelo	2,000,000 USD /ha (Lambert et al., 2000)
	Vitrificación	Aplicación de una corriente eléctrica al suelo a altas temperaturas (1600 – 2000 °C), formando vidrio estable inmovilizando compuestos inorgánicos	1,000,000 USD /ha (Lestan et al., 2006)
Estabilización	E. Química	Aplicación de agentes químicos para reducir la biodisponibilidad del contaminante	2,000,000 USD /ha (Lambert et al., 2000)
	Fitoestabilización	Uso de plantas para estabilizar el suelo disminuyendo la movilidad del contaminante	10,000 USD /ha (EPA 2000)
Remoción	R. Electrocinética	Instalación de electrodos por debajo de la superficie del suelo aplicando una corriente directa de baja intensidad provocando movilidad de los metales	1,200,000 USD /ha (EPA 2000)
	Lavado de suelo	Utilizar algún agente (e.g. agua) para extraer el contaminante	100,000 USD /ha (Lestan et al., 2006)
	Fitoextracción	Es una técnica basada en el uso de plantas vivas (Sección 1.3)	40,000 USD /ha (EPA 2000)

1.3 Fitoremediación.

La fitoremediación se define como el uso de plantas verdes para remover contaminantes del ambiente o para disminuir su toxicidad (Evangelou et al., 2006).

Una ventaja de estas tecnologías es que se pueden utilizar para contaminantes orgánicos e inorgánicos además de que puede actuar en diferentes matrices (e.g. suelo y agua) (**Salt et al., 1998**).

1.3.1 Técnicas de Fitoremediación.

A continuación se enlistan las principales técnicas de fitoremediación (**Qiao et al., 2010, Salt et al., 1998**).

Tabla 1.4 Técnicas de fitoremediación.

Técnica	Descripción
Fitovolatilización	Uso de plantas para volatilizar compuestos volátiles ya sea orgánicos o inorgánicos.
Fitoestabilización	Uso de plantas para disminuir la biodisponibilidad de los contaminantes en el medio ambiente
Fitodegradación	Uso de plantas asociadas con los microorganismos rizosféricos para degradar contaminantes orgánicos
Rizofiltración	Uso de las raíces de las plantas para absorber o adsorber contaminantes, principalmente metales, de aguas contaminadas así como de corrientes de agua
Fitoextracción	Uso de plantas acumuladoras de contaminantes para remover metales o contaminantes orgánicos del suelo mediante la concentración en las partes aéreas de las plantas

Investigaciones científicas recientes han demostrado la efectividad que tiene estas técnicas para la remediación de sitios contaminados. En particular, los estudios se han enfocado en la investigación de la fitoextracción debido a que se ha demostrado una buena relación costo-beneficio (**Chaney et al., 2005**), esto al menos cuando los niveles de contaminación son de bajos a moderados y la extensión del sitio contaminado es elevada (**Lesage et al., 2005, Salt et al., 1998**).

1.3.2 Fitoextracción.

Como ya se ha mencionado la fitoextracción involucra el uso de plantas verdes para remover contaminantes orgánicos e inorgánicos ya sea de suelo o de agua (Evangelou *et al.*, 2006). Existe un gran número de estudios científicos que se enfocan en la remediación de metales en suelos. En la Tabla 1.5 se muestran los rangos de concentraciones de metales que se pueden llegar a encontrar comúnmente en suelos impactados.

Tabla 1.5 Rangos de concentración de metales pesados encontrados en suelos contaminados (Salt *et al.*, 1998).

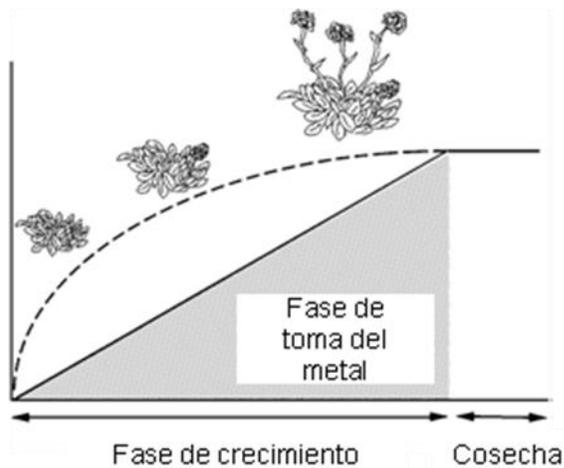
Metales	Rango de concentraciones (mg/kg)
Arsénico	0.1 – 102
Cadmio	0.1 – 345
Cobre	0.03 – 550
Cromo	0.005 – 3,950
Mercurio	0.0001 – 1,800
Plomo	1 – 6,900
Zinc	0.15 – 5,000

Ahora bien, la fitoextracción se puede subdividir a su vez en dos estrategias, la primera es la fitoextracción asistida por agentes quelantes también llamada fitoextracción inducida, y la segunda es la fitoextracción a largo plazo o fitoextracción continua, siendo la fitoextracción inducida la que ha tenido un mayor desarrollo incluso llegando a ser hoy en día comercializada (Schroeder *et al.*, 2009, Fassler *et al.*, 2010).

La fitoextracción continua (Imagen 1.2) se basa en la capacidad de un selecto número de plantas capaces de acumular/concentrar/biomagnificar de manera natural los contaminantes metálicos del suelo, en este sentido, la cantidad de

metales que estas plantas acumulan puede representar del 1% a 5% (Schroeder *et al.*, 2009) de su biomasa seca en las partes aéreas de las plantas. Los principales metales reportados que estas plantas acumulan son Zn, Ni, Mn y Se. Sin embargo, hay otro grupo de metales tales como Pb, Cd, As que difícilmente son acumulados ya que solo hay pocas especies reportadas que tienen esta capacidad (Baker *et al.*, 2007, Salt *et al.*, 1998).

Imagen 1.2 Esquemización de fitoextracción continua (FC).



La línea sólida representa la concentración del metal en la biomasa mientras que la línea punteada representa el crecimiento de la planta (modificado de Salt *et al.* 1998).

Ahora bien, la capacidad de las plantas de acumular metales de manera natural en cantidades excepcionales se conoce como hiperacumulación, siendo las concentraciones enlistadas en la Tabla 1.6 las consideradas dentro del criterio de hiperacumulación (Lesage *et al.*, 2005).

Tabla 1.6 Criterios para considerar una planta como hiperacumuladora de metales (mg/kg base seca) (Lesage et al., 2005).

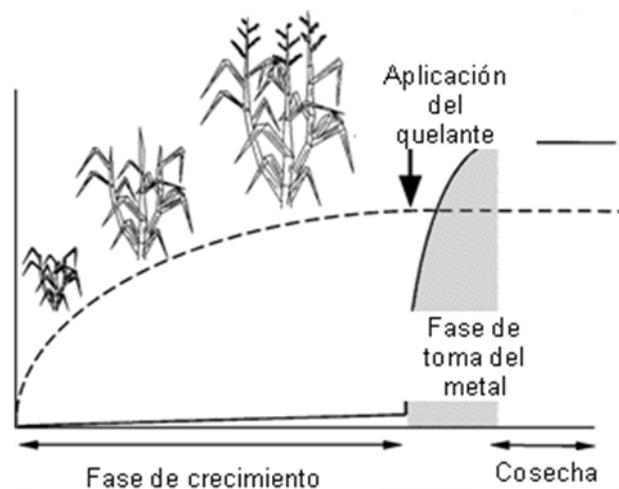
Metal	mg/kg en tallo (base ceca)
Cadmio	> 100
Cobalto	> 1,000
Cobre	> 1,000
Cromo	> 1,000
Plomo	> 1,000
Níquel	> 1,000
Manganeso	> 10,000
Zinc	> 10,000

A partir de la escasez de plantas hiperacumuladoras se desarrolló la idea de utilizar otro tipo de especies vegetales para la remediación de sitios contaminados modificando la biodisponibilidad de los metales del suelo, es decir, surgió la idea de la fitoextracción asistida por agentes quelantes (Imagen 1.3). El principio es simple, utilizar plantas que toleren la toxicidad de los metales y además tengan la capacidad de extraerlos del suelo (**Robinson et al., 2003**) (e.g. mostaza india, tabaco, maíz) y aplicar un agente quelante (e.g. ácido etilen diamino tetracético (EDTA)) al suelo para aumentar tanto la biodisponibilidad de los metales como la capacidad de la planta de tomarlos del suelo acumulándolos en las partes cosechables de esta (**Salt et al., 1998**).

Para que ocurra la acumulación de metales en las partes aéreas de las plantas es necesario que ocurra una translocación del metal de la raíz hacia el tallo de la planta. La translocación de los metales es una función biológica bien conocida (**Schroder et al., 2009**). Una vez que el complejo metal-quelante (M-Q) se introduce a la planta por la raíz, este pasa al xilema de la plantas y

mediante dos mecanismos la planta puede llegar a atrapar el M-Q en los tallos (**Schroder et al., 2009**). Para el primer mecanismo, las células toman el complejo M-Q y lo atrapan en la pared celular antes de que este llegue a sitios sensibles a la presencia de los metales. El segundo mecanismo consiste en que las células de la planta toma el complejo M-Q y mediante proteínas transportadoras de membrana introducen el complejo a la célula y lo atrapan en las vacuolas para evitar los efectos tóxicos de los metales (**Schroder et al., 2009**). Se han detectado incluso familias de genes que se sobre expresan tras el estrés ocasionado por la toxicidad de los metales aumentado la producción de proteínas tales como metalotioninas o metaloenzimas, que promueven la translocación de los metales de la raíz hacia el tallo y las hojas de las plantas, donde serán secuestradas para disminuir la toxicidad de los metales (**Schroder et al., 2009**). Incluso se han detectado almacenes en el citosol en plantas hiperacumuladoras (**Korenkov et al., 2007**).

Imagen 1.3 Esquematización de fitoextracción inducida químicamente (FIQ).



La línea sólida representa la acumulación del metal en la biomasa de la planta y la línea punteada representa la biomasa producida (modificado de **Salt et al., 1998**).

Retos de la fitoextracción.

Si bien la fitoextracción se ha venido desarrollando como una tecnología ambientalmente amigable y con una relación costo-beneficio bastante promisoro también presenta una serie de desafíos en los cuales los científicos han puesto un gran esfuerzo por mejorar (**do Nascimento et al., 2006, Salt et al., 1998, Ulery et al., 2008**).

- Plantas hiperacumuladoras: El problema en este aspecto radica en el reducido número de plantas hiperacumuladoras conocidas. De igual manera, la baja biomasa generalmente producida por estas plantas (**do Nascimento et al., 2006**) limita en gran medida la cantidad de metales que puede llegar a extraer (**Salt et al., 1998**).
- Biodisponibilidad de los metales: La mayor problemática de la fitoextracción es la baja biodisponibilidad de los metales contaminantes en el suelo que facilite su absorción por las plantas. Este problema promovió, en estudios anteriores, el uso de agentes acomplejantes (e.g. EDTA, nitrilo acetato (NTA), etilen glicol tetra acético (EGTA)) y la disminución del pH del suelo para aumentar la biodisponibilidad (**Epelde et al., 2008, Salt et al., 1998, Lesage et al., 2005, Cui et al., 2004**).
- EDTA en fitoextracción: El EDTA se considera como el agente quelante por excelencia, sin embargo, su principal desventaja al ser aplicado a suelos contaminados es la capacidad para formar complejos muy

estables y por lo tanto persistentes con los metales pesados, pudiendo ser un factor potencial de la movilidad de los metales (lixiviación) llegando así a contaminar aguas subterráneas (**Salt et al., 1998**).

Ventajas frente a otras técnicas.

Una de las principales ventajas en cuanto a otras técnicas de remediación es el costo de operación (**EPA 2000, Ulery et al., 2008, Robinson et al., 2005**) (e. g. la sustitución del suelo contaminado por suelo limpio tiene un costo aproximado de 100 a 500 USD/m³ de suelo (**Ulery et al., 2008**)).

Otra de las ventajas por las cuales ha ido en ascenso tanto su investigación como la aplicación es precisamente que es una tecnología ambientalmente amigable y tiende a ser poco invasiva en relación con otras técnicas (**Todd et al., 2004**). Según la EPA (**2000**), se estima que el costo para llevar a cabo la remediación de un sitio de 5 ha contaminado por Pb mediante la excavación y disposición del suelo sería de 12,000,000 USD; aplicando un lavado al suelo 6,300,000 USD; mientras que cubrir ese suelo utilizando algún agente cementante el gasto sería de 600,000 USD. Sin embargo, utilizando una técnica llamada fitoextracción (ver apartado 1.3.2.) el gasto sería de 200,000 USD (**EPA 2000**).

Fitoextracción asistida por AOBPM

Debido a los riesgos asociados con el uso de EDTA para la FIQ se ha propuesto el uso de otro tipo de agentes quelantes tales como ácidos orgánicos de bajo peso molecular (AOBPM) (**Evangelou et al., 2006, Ulery et al., 2008**,

Liu et al., 2008, do Nascimento et al., 2006, Chen et al., 2003, Lesage et al., 2005).

Si bien es cierto que es necesario realizar más estudios para comprender los mecanismos por los cuales las plantas toman los metales del suelo, así como mejorar las tecnologías propuestas para evitar contaminaciones subsecuentes y aumentar la capacidad de las plantas para extraer los metales (**Schroeder et al., 2009**), la fitoextracción asistida por AOBPM se propone como una alternativa ambientalmente viable (**Salt et al., 1998**).

La ventaja de aplicar los AOBPM en lugar de EDTA en suelos contaminados para aumentar la biodisponibilidad de los metales presentes y facilitar la acumulación de estos por las plantas en el proceso de fitoextracción radica en el corto tiempo de vida que tienen los AOBPM disminuyendo lixiviación de los metales (**Liu et al., 2008, Sun et al., 2001, Cui et al., 2004, Chen et al., 2003**).

La fitoextracción asistida por AOBPM pretende aumentar la biodisponibilidad de los metales pesados en el suelo en un periodo de tiempo razonable (días o semanas) (**Liu et al., 2008**) aumentando la acumulación de metales en un proceso de fitoextracción (**Lestan et al., 2006**).

Debido a los antecedentes presentados, el presente trabajo pretende estudiar el efecto de 9 AOBPM (comúnmente encontrados comercialmente); sobre la solubilidad de los metales pesados presentes en un suelo contaminado en la Zona Metropolitana de Monterrey (ZMM), así como estudiar la capacidad de 3 especies vegetales para llevar a cabo el proceso de fitoextracción. En dicho predio es conocida la contaminación del suelo por metales pesados ya que

estos terrenos pertenecieron en el pasado a una industria dedicada al refinamiento de los metales. Esta compañía fue clausurada en el año de 1993 por la PROFEPA debido a que la empresa confinó de manera ilegal 500 mil toneladas de residuos industriales peligrosos sin ser sometidos a algún tratamiento para minimizar sus efectos al ambiente (**La Jornada 2006**).

1.4 Justificación.

Debido al efecto adverso que puede presentar el uso inadecuado del EDTA como agente quelante, el presente trabajo propone el uso de agentes químicos de rápida biodegradabilidad (AOBPM), como alternativa para inducir la biodisponibilidad de los metales pesados contaminantes exclusivamente durante el tiempo de crecimiento y acumulación por las plantas en un sistema de fitoextracción en campo, reduciendo así el riesgo asociado a la persistencia de agentes secuestrantes sintéticos.

1.5 Hipótesis.

La aplicación individual de AOBPM (ácido málico y cítrico), aumenta selectivamente la solubilidad y biodisponibilidad de metales Pb y Zn durante el tiempo de crecimiento de plantas acumuladoras *Brassica juncea* en un suelo contaminado real.

1.6 Objetivos.

1.6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la aplicación individual de AOBPM sobre la solubilidad y fitoextracción de metales pesados en un suelo contaminado.

1.6.2 Objetivos específicos

- Identificar los AOBPM con la mejor capacidad de solubilizar metales selectivamente y no selectivamente en un suelo contaminado.
- Realizar pruebas indirectas de biodegradabilidad de los ácidos orgánicos mediante extracción de la fase metálica soluble del suelo a diferentes periodos de tiempo.
- Evaluar las especies vegetales que tengan la capacidad de tolerar y extraer metales de un suelo contaminado.
- Determinar las concentraciones óptimas de los AOBPM utilizados para la solubilización y fitoextracción de metales del suelo.
- Realizar una prueba piloto de fitoextracción *In Situ* como alternativa y/o complemento de remediación para el área de estudio basado en los resultados del proyecto.

CAPITULO 2

2 MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Equipos y Materiales Utilizados

Tabla 2.1 Material y equipo utilizado en cada determinación y su localización.

Determinación	Material y Equipo	Ubicación
Muestreo	Pala, pico, bolsas de plástico tipo PET, tamíz de 4 mm y de 2 mm.	LICAA, IB
Secado	Estufa aireada (Quincy Lab. Inc. 40GC)	LICAA
Textura	Hidrómetro de Bouyoucos, probeta graduado a 1 L, batidora, termómetro (110 °C).	IB
pH	Potenciómetro (Bechman), Shaker (Lab-line 3527)	IB
Materia Orgánica	General	LICAA, IB
Capacidad de Campo	General	LICAA, IB
Humedad	Estufa aireada (Quincy Lab. Inc. 40GC)	LICAA
Capacidad de Intercambio Catiónico	Espectrofotómetro de plasma acoplado inductivamente (IRIS Intrepid II)	IB
Extracción de Metales	Plancha de termoagitación (Thermolyne Cimarec 3), campana de extracción (Labconco Basic 47)	IB
Determinación de Metales	Espectrofotómetro de plasma acoplado inductivamente (IRIS Intrepid II), espectrofotómetro de absorción atómica (GBC 932).	IB, LSO, LAI
Pruebas Preliminares	Tubos Falcon de 50 mL mezclador vertical de tubos Falcon (diseño propio), macetas (1 kg).	LICAA
Prueba Piloto de Fitoextracción	Macetas (1 kg) charolas de propagación de 200 pocillos, aspersor de agua manual de 1.5 L.	LICAA, FA

General	Pipetas serológicas de 1, 5 y 10 mL, pipetor automático de 1, 5 10 mL, vasos de precipitado, matraces volumétricos, probeta de 100 mL, tubos Falcon de 50 mL, crisoles de porcelana, mechero tipo Bunsen, balanza analítica (AND GF-200) y granataria manguera para agua.	LICAA
---------	---	-------

LICAA: Laboratorio de Investigación en Ciencias de Alimentos y Ambiental, IB: Instituto de Biotecnología, LSO: Laboratorio de Síntesis Orgánica, LAI: Laboratorio de Análisis Instrumental, FA: Facultad de Agronomía.

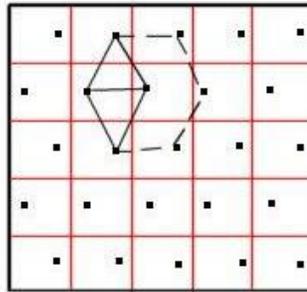
2.2 Suelo

2.2.1 Muestreo

Se seleccionó un sitio que de acuerdo a la bibliografía existente (**La Jornada 2006**) estuviera contaminado con metales pesados. En especial se requería que el sitio de estudio, además de tener contaminación por metales pesados, sobrepasara los LMP de las regulaciones tanto nacionales como extranjeras (**PROY NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, EPA, Unión Europea**). El sitio de muestro se localiza en la ZMM en las inmediaciones de las calles Guerrero y Progreso.

El muestreo del suelo se llevó a cabo de acuerdo a la metodología del triangulo-diamante-hexágono descrita por Reetz (**2001**) (Imagen 2.1) con el fin de asegurar un muestreo representativo del sitio.

Imagen 2.1 Muestreo del Triangulo-diamante-hexágono según Reetz (2001).



Se seleccionaron 3 zonas de muestreo (35, 48 y 36 m²) de acuerdo a su localización y accesibilidad para la recolección de las muestras (Imagen 2.2). Se tomaron las muestras puntuales (50 g) necesarias para asegurar el muestreo de todo el sitio teniendo un total aproximado de 2-3 kg de suelo muestreado por zona. Posteriormente se mezclaron las muestras puntuales por zona para generar tres muestras compuestas homogéneas.

Imagen 2.2 Zonas de muestreo.



Foto tomada de tomado de Google Earth.

2.2.2 Preparación y Análisis de las Muestras de Suelo Colectadas

Una vez tomadas las muestras, se prosiguió a cribarlas a través de un tamiz de 4 mm para retirar basura, hojas, palos, piedras, etc. Posteriormente se hizo pasar el suelo por un tamiz de 2 mm y una muestra homogénea se llevó a sequedad en una estufa aireada a 100 °C por un lapso de 48 horas y se le determinaron los parámetros fisicoquímicos, descritos en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Parámetros fisicoquímicos analizados en el suelo estudiado y los métodos seguidos para su determinación.

Parámetros Analizados	Método Utilizado
Textura	AS-09 NOM-021-RECNAT-2000
pH	AS-02 NOM-021-RECNAT-2000
Materia Orgánica	AS-02 NOM-021-RECNAT-2000
Capacidad de Campo	Koopmans <i>et al.</i> , 2007
Humedad	AS-02 NOM-021-RECNAT-2000
Capacidad de Intercambio Catiónico	Método oficial 10 (MAPA 1994)
Extracción de Metales Totales	ISO 11466
Cuantificación de Metales	ISO 11466

Humedad (H).

El método se basa en la determinación del contenido de humedad de la muestra de manera indirecta.

Procedimiento.

Se tararon crisoles a 100 °C. Se pesaron 10 gr de suelo después de cribar en crisoles previamente tarados y se llevaron a la estufa a 100 °C por espacio de 24 horas. Se dejaron enfriar en un desecador con CaCO₃ por 30 minutos y se llevaron a peso constante. Se registraron los pesos. Se utilizó la ecuación (1) para la determinación del porcentaje de humedad de cada uno de los sitios muestreados.

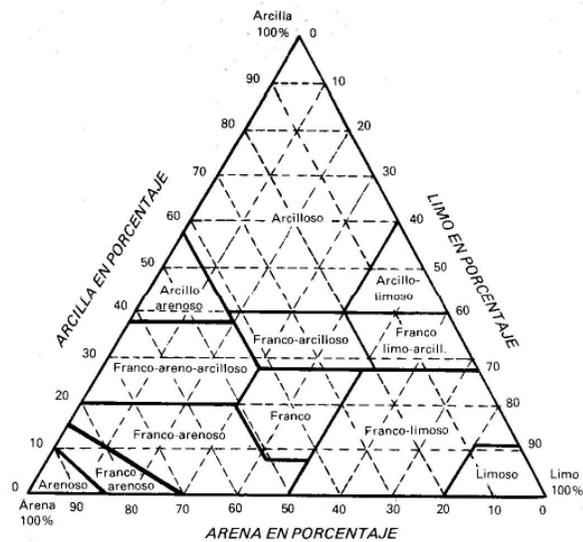
$$\% \text{ de humedad} = \frac{(M1 - M2) \times 100}{M} \quad (1)$$

Donde M1: Peso del crisol más muestra húmeda, M2: Peso del crisol más muestra seca y M: Peso de la muestra sola.

Textura.

El método consiste en determinar los porcentajes presentes de arcilla, arena y limo en la muestra de suelo. Una vez obtenidos los porcentajes se trazan líneas rectas a lo largo del grafico de Clases Texturales de suelo (Imagen 2.3). El tipo de suelo será el punto donde las tres líneas trazadas convergen.

Imagen 2.3 Clases texturales de suelo.



Reactivos Utilizados.

- Alcohol amílico.
- Hexametáfosfato de sodio 1N, como agente dispersante.

Procedimiento.

Se transfirieron 40 g de suelo seco a un recipiente adecuado para llevar a cabo el homogenizado de la muestra. Se agregaron 100 mL de agua destilada más 10 mL de agente dispersante. Se dejó reposar por un periodo de 5 minutos y

después se homogeneizó con la ayuda de una batidora casera por un lapso de 25 minutos.

La mezcla fue transferida a una probeta de 1000 mL y se tomó la temperatura de la suspensión. Se introdujo el hidrómetro de Bouyoucos a los 40 segundos y se tomó la primera lectura. Dos horas después se tomó la segunda lectura del hidrómetro y de la temperatura. Una vez tomadas las dos lecturas se utilizó la Tabla 2.3 para corrección de las lecturas en función de la temperatura y se calcularon los porcentajes de arena, arcilla y limo utilizando las siguientes fórmulas (2):

$$\% \text{ de Arena} = 100 - (2 \times 1^{\text{a}} \text{ lectura corregida})$$

$$\% \text{ de Arcilla} = 2 \times 2^{\text{a}} \text{ lectura corregida} \quad (2)$$

$$\% \text{ de Limo} = 100 - (\% \text{ Arena} + \% \text{ Arcilla})$$

Tabla 2.3 Corrección de lecturas.

Temperatura °C	Factor de Conversión
14	- 1.46
16	- 0.98
18	- 0.44
19.5	0.00
20	0.18
22	0.89
24	1.16
26	2.41
28	4.1

Posteriormente se trazaron las líneas en la gráfica de clases texturales para la clasificación de las muestras de suelo colectadas.

pH.

El método consiste en solubilizar los componentes principales del suelo que proveen la acidez o alcalinidad del suelo en estudio.

Reactivos Utilizados.

- Agua desionizada.
- Soluciones reguladoras de pH 4, 7 y 10.

Procedimiento.

Se pesaron por separado 10 gr de suelo seco, de cada una de las muestras, en matraces Erlenmeyer de 250 mL por duplicado. Se agregaron 10 mL de agua desionizada y se colocaron en un Shaker a temperatura ambiente a 50 rpm durante 30 minutos. Se calibró el potenciómetro con las soluciones reguladoras de pH de 4, 7 y 10, se tomaron las lecturas de pH de la solución de suelo.

Materia orgánica (MO).

El método se basa en la ignición de la materia orgánica y su determinación de manera indirecta por diferencia de peso.

Procedimiento.

Primeramente se llevó a cabo la tara de crisoles a una temperatura de 360 °C. En cada crisol se pesaron 5 gr de suelo seco por duplicado. Posteriormente se calcinaron las muestras utilizando un mechero Bunsen y se dejaron enfriar a temperatura ambiente en un desecador con CaCO₃ por 30 minutos. Se introdujeron las muestras en una mufla a 360 °C por 2 horas, se dejaron enfriar

en desecador y se registraron los pesos. La ecuación (3) se utilizó para determinar el porcentaje de materia orgánica presente en el suelo analizado.

$$\% \text{Materia orgánica} = \frac{100 - (W1 - W2) \times 100}{W} \quad (3)$$

Donde W1: Peso del crisol más muestra (después de ignición), W2: Peso del crisol tarado y W: Peso de la muestra seca.

Capacidad de campo (CC).

Este método consiste en determinar la cantidad de agua que puede llegar a retener una muestra de suelo.

Procedimiento.

Se determinó el peso del agua pesando un vaso de precipitado y agregándole 10 mL de agua destilada. Se pesaron 100 gr de suelo seco por duplicado en vasos de unicel horadados en el fondo para permitir el flujo del agua. Se colocaron los vasos sobre un recipiente para colectar el agua filtrada a través del suelo. Se les agregaron 100 mL de agua a cada uno, el agua colectada se recirculó tres veces. Se taparon los vasos con una película plástica para evitar la evaporación del agua dejando escurrir por un tiempo de 24 horas y se pesaron una segunda vez.

Por diferencia de peso se determinó la capacidad de campo de cada una de las muestras analizadas (4).

(4)

Donde P3: Peso drenado tras 24 horas, P2: Peso de la muestra seca y P1: Peso del vaso solo.

Capacidad de intercambio catiónico (CIC).

El método se basa en la solubilización y extracción de los cationes presentes en una muestra de suelo.

Reactivos.

- Acetato de amonio 1M
- Estándares certificados de Na, K, Ca y Mg de 1000 mg/L marca RICCA.

Procedimiento.

Se colocaron 5 gramos de suelo seco en matraces Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 100 mL de acetato de amonio 1M. Los matraces se agitaron por espacio de 30 minutos en un Shaker a 50 rpm. Se filtró la solución del suelo (Whatman 40) y se almacenó la muestra a 4 °C hasta su análisis por EAA/ICP.

Para la determinación de los cationes se utilizó EAA/ICP el ubicado en las instalaciones del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Para dicho análisis se preparó un estándar conteniendo los cationes a determinar a una concentración de 30 mg/kg para la calibración del equipo. Posteriormente se introdujeron las muestras para su lectura en el equipo y se registraron las concentraciones reportadas por el mismo.

Análisis de metales totales.

El método se basa en la disolución de los metales pesados totales presentes en una muestra de suelo o especie vegetal, al ser sometido a un ataque con ácidos fuertes o una mezcla de ellos, en el caso del suelo se utilizó agua regia (HNO_3 y HCl 3:1). Para llevar a cabo la digestión de plantas se utilizó solamente ácido nítrico (conc.).

Reactivos Utilizados.

- Ácido nítrico (HNO_3) concentrado.
- Ácido clorhídrico (HCl) concentrado.

Procedimiento.

Se pesaron entre uno y dos gramos de muestra seca en matraces Erlenmeyer de 250 mL libre de impurezas, los análisis se efectuaron por sextuplicado.

Se agregaron lentamente 10 mL de agua regia por las paredes del recipiente (HNO_3 para las plantas) y se llevó a ebullición hasta tener aproximadamente 3 – 4 mL remanentes. En caso de que se observara en el fondo del matraz muestra aún sin digerir, se agregaron nuevamente 10 mL de agua regia y se llevó a ebullición hasta obtener nuevamente 3 – 4 mL. En caso de que las digestiones de las plantas no fueran totales se repite el paso de igual manera pero con HNO_3 .

Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez fría la solución se filtró (Whatman 40) y se aforó a 50 mL. Se almacenó la muestra en refrigeración a 4 °C hasta su análisis.

Preparación de las muestras vegetales.

Las plantas cultivadas en cada experimento se cosecharon cortando entre uno y dos centímetros por arriba del nivel del suelo. Las muestras se colocaron en bolsas herméticas para evitar la pérdida de humedad. Posteriormente a la determinación del peso fresco de las especies colectadas, se lavaron con agua corriente y con una solución de HNO_3 (0.01 M) para remover la suciedad de las hojas y metales adsorbidos en estas. Después, se pre-secaron al aire a temperatura ambiente para eliminar parte de la humedad antes de introducir las a la estufa a 100°C por un periodo de 48 h para registrar el peso seco.

Las plantas secas del experimento en campo se molieron en una licuadora para asegurar la homogeneidad de la muestra a digerir. Posterior a este tratamiento se procesaron como ya se ha mencionado. Es importante aclarar, para el caso de los experimentos de fitoextracción en campo y bajo condiciones controladas, la cosecha se realizó posterior a la floración pero antes de la fructificación.

Cuantificación de metales.

El método se basa en la atomización de la muestra para liberar los átomos del analito, en este caso metales pesados, a los que se les aplica una energía de una longitud de onda específica que es absorbida por el átomo e induce al electrón a pasar a un estado excitado. La energía absorbida es proporcional a la concentración del elemento en la muestra analizada.

Algunos de los análisis efectuados se realizaron mediante el equipo de ICP proporcionado por el Instituto de Biotecnología (IB) de la Facultad de Ciencias

Biológicas de la UANL. Otros se realizaron utilizando los equipos de EAA del Laboratorio de Síntesis Orgánica (LSO) y del Laboratorio de Análisis Instrumental (LAI) de la Facultad de Ciencias Químicas

Reactivos Utilizados.

- Estándares certificados de Pb de 1000 mg/L marca RICCA.
- Estándares certificados de Cd de 1000 mg/L marca RICCA.
- Estándares certificados de Zn de 1000 mg/L marca RICCA.
- Estándares certificados de Ni de 1000 mg/L marca RICCA.

Procedimiento.

Una vez generadas las muestras para analizar proveniente de las extracciones ya mencionadas, se prosiguió a llevar a cabo su análisis. Primeramente se prepararon una serie de estándares para validar las mediciones (Tabla 2.4).

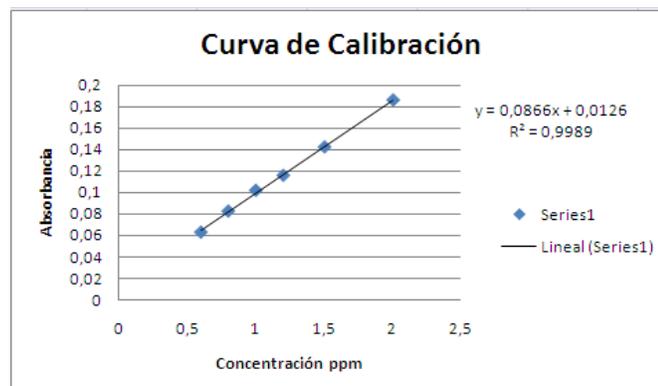
Tabla 2.4 Concentración de los estándares para la calibración de los equipos.

Equipo Analítico	Metales Analizados	Rango de Concentración de los Estándares (mg/L)
ICP/EAA (IB)	Plomo	1 – 50
	Zinc	1 – 50
	Cadmio	1 – 50
	Níquel	1 – 50
EAA (LSO)	Plomo	2 – 20
	Zinc	0.4 – 1.9
	Cadmio	0.05 – 1
	Níquel	0.6 – 4
EAA (LAI)	Plomo	0.5 – 3
	Zinc	0.1 – 1.5

ICP: Plasmo Acoplado Inductivamente, EAA: Espectroscopia de Absorción Atómica, IB: Instituto de Biotecnología, LSO: Laboratorio de Síntesis Orgánica, LAI: Laboratorio de Análisis Instrumental.

Una vez obtenidas las lecturas de absorción de cada uno de los estándares se construyo la curva de calibración (Imagen 2.4) para cada uno de los metales analizados utilizando una hoja de cálculo del programa Microsoft EXCEL y validar así la medición próxima de las muestras. Se tomaron las lecturas de absorción de cada muestra generada. Los datos obtenidos se cargaron en el mismo programa MS EXCEL para cuantificar la cantidad de metales (mg/L) presentes en cada una de las muestras.

Imagen 2.4 Ejemplo de una curva de calibración generada en una hoja de cálculo (Excel).



2.3 Pruebas Preliminares

2.3.1 Pruebas de Solubilidad de Metales Pesados Asistida por AOBPM

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto en la solubilidad de los metales por los AOBPM. Una vez obtenidos los datos de caracterización del suelo, se escogió uno solo de los puntos muestreados basado en sus niveles de contaminación para continuar con las siguientes fases experimentales.

Esta prueba se subdivido en tres fases, la primera fase se enfoco en determinar un método adecuado para extraer solución del suelo para su análisis. La

segunda fase se enfocó en el diseño de un equipo que asegurara la mezcla completa de los componentes, es decir, el suelo con la solución de los AOBPM. La tercera fase fué el diseño de las condiciones del experimento: tiempos de exposición, concentraciones, número de muestras y el montaje del experimento. Para la primera fase del experimento se pesaron 30 gr de suelo seco en tubos Falcon de 50 mL y se les agregaron 30 mL de agua destilada para asegurar la saturación completa del suelo. Posteriormente se mezclaron perfectamente y se colocaron en una centrifuga a 2500 rpm por un espacio de 5, 10 y 15 minutos. La solución sobrenadante se pasó a través de un filtro Whatman 40 (método modificado de **Ulery et al., 2008, Liu et al., 2008**).

Para la segunda fase experimental se diseñó y construyó un aparato para la mezcla homogénea de suelo y tubos Falcon de 50 mL de manera vertical y no de manera horizontal como en un Shaker convencional. Esto debido a que en este último la mezcla sólido-líquido no se realiza correctamente debido a que la solución permanecía casi en su totalidad en la parte superior.

Para la tercer fase se seleccionaron algunos de los AOBPM reportados en la bibliografía (**Chen et al., 2003, Ulery et al., 2008, Liu et al., 2008, do Nascimento et al., 2006, Evangelou et al., 2006, Lesage et al., 2005**) y otros que aún no muy estudiados (Tabla 2.5).

Tabla 2.5 AOBPM y controles utilizados en las pruebas preliminares.

AOBPM	Concentraciones	Toxicidad reportada (HDS)
Ascórbico	10 y 50 mM	N/D
Aspártico	10 y 50 mM	N/D
Cítrico	10 y 50 mM	DL rata 3,000 mg/kg
Málico	10 y 50 mM	N/D
Oxálico	10 y 50 mM	DL rata 7,500 mg/kg
Succínico	10 y 50 mM	DL rata 2,260 mg/kg
Sulfanílico	10 y 50 mM	DL rata 12,300 mg/kg
Tartárico	10 y 50 mM	N/D
Úrico	10 y 50 mM	N/D
EDTA*	50 y 100 mM	DL 2,000 mg/kg
CaCl ₂ *	10 y 100 mM	N/D
Agua destilada	-----	-----

*mM: mmoles; N/D: no determinado. HDS: hojas de seguridad de reactivos. * Tratamiento control.*

Los análisis de cada uno de los AOBPM a estudiar, así como de los controles, se llevaron a cabo por duplicado.

Se prepararon 100 mL de las soluciones de cada concentración de los AOBPM y de los controles. Se colocaron 30 gr de suelo seco contaminado en tubos Falcon de 50 mL y se agregaron 35 mL de las soluciones experimentales (Tabla 2.5) para asegurar la saturación completa del suelo con la solución.

Posteriormente se colocaron los tubos en el mezclador vertical por espacio de 48 h a 16 rpm, con el fin de obtener la mayor cantidad de metal solubilizado por los ácidos. Posteriormente se extrajeron las soluciones, por centrifugación y filtrando (Whatman 40) del sobrenadante, las muestras se acidificaron para evitar la pérdida de los metales y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis por EAA (Sección 2.2.2., Análisis de metales).

2.3.2 Pruebas de Adaptación y Tolerancia.

Para esta prueba se seleccionaron 3 especies vegetales en base a la bibliografía dos variedades de *Zea mays* (regional y Asgrow), una variedad de la familia *Brassica juncea* (mostaza regional) y una variedad de *Nicotiana tabacum* (tabaco).

Se prepararon tres niveles de contaminación del suelo a diferentes dosis acondicionado con el sustrato Peat-moss, se incluyó un blanco con suelo agrícola no contaminado (marca Premier) (Tabla 2.6).

Tabla 2.6 Niveles de suelo contaminado acondicionado con Peat-moss para pruebas de adaptabilidad y tolerancia.

	Blancos	100% Suelo Contaminado	80% Suelo Contaminado	60% Suelo Contaminado
Suelo contaminado	800 g	800 g	300 g	200 g
Sustrato Peat-moss	0	0	75 g	133 g

Los porcentajes están dados en P/P.

Para el cultivo de todas las especies vegetales mencionadas en el presente trabajo se utilizaron macetas y se realizó en las instalaciones de los invernaderos de la Facultad de Agronomía de la UANL.

Se sembraron las semillas en el suelo a una profundidad adecuada para cada una de las semillas, 1 cm en el caso del maíz; 0.5 cm para la mostaza y casi superficial para el tabaco. Para las dos variedades de maíz se sembraron 7 semillas por cada una de las macetas; para la mostaza, se sembraron 9 semillas por cada maceta y para el tabaco se plantó una cantidad de entre 5-8 semillas por pocillo en cada maceta. Las pruebas se realizaron por duplicado.

Las macetas se saturaron para alcanzar el 100% de CC y se cubrieron con plástico negro para evitar la evaporación del agua. Posterior a la emergencia las macetas se descubrieron y se colocaron en el invernadero sobre un plato de unicel para coleccionar los lixiviados metálicos del suelo y recircular las soluciones coleccionadas.

Las plantas fueron monitoreadas a diario para mantener la humedad del suelo. Luego de 4 semanas se realizó la cosecha de las partes aéreas de las plantas. Inmediatamente después del corte se determinó el peso fresco de las plantas. Las plantas cosechadas en cada maceta constituyeron una muestra.

Las plantas cosechadas se secaron en bolsas de papel en una estufa aireada a 100°C por 48 h, posteriormente se dejaron enfriar por 30 minutos dentro de un desecador con CaCO₃ para determinar el peso seco de las muestras. Se continuó con la digestión de las plantas para extraer y cuantificar los metales tomados.

2.3.3 Pruebas Indirectas de Degradación de AOBPM.

El objetivo de esta prueba fue determinar el efecto en la solubilidad de los metales en función del tiempo (9 días) (Liu *et al.*, 2008) y de esta manera determinar la efectividad con respecto al tiempo de acción de los AOBPM. Esta prueba se realizó con los AOBPM seleccionados las pruebas anteriores.

Se prepararon 10 tubos Falcon de 50 mL por duplicado con 30 gr de suelo seco. A 5 tubos se les agregó un AOBPM seleccionado en pruebas anteriores a una concentración de 100 mmoles/kg y 5 más a 50 mmoles/kg; se preparó la

misma cantidad de tubos para el otro AOBPM. Posteriormente se les agregó 30 mL de agua desionizada. Se incluyeron 2 blancos con agua destilada.

Los tubos se mezclaron en el mezclador vertical a distintos tiempos específicos 3 horas en el caso de los blancos; 1, 3, 5, 7 y 9 días para los AOBPM. Al momento de retirar cada tubo se le extrajo la solución (Sección 2.3.1) para determinar las concentraciones de los metales (Sección 2.2.2. Análisis de metales).

2.4 Pruebas Piloto de Fitoextracción.

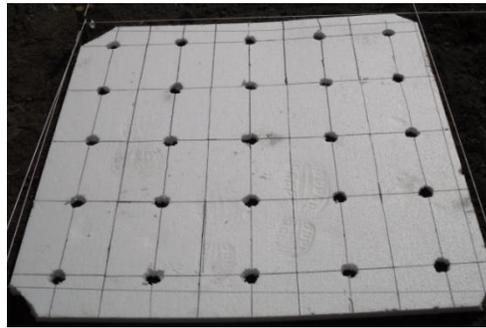
Antes de llevar a cabo el montaje experimental en campo se realizó la limpieza del sitio destinado para la prueba de fitoextracción, la Imagen 2.7 demuestra el proceso de acondicionamiento del sitio que se realizó para mejorar las condiciones de cultivo de las plantas.

Imagen 2.7 Limpieza del sitio para el montaje experimental. Antes y después de la limpieza.



Se utilizó un pliego de unisel de 1 m² para utilizarlo como plantilla haciendo orificios a la distancia correspondiente al lugar de siembra de cada planta (Imagen 2.8) para facilitar el espaciado entre plantas.

Imagen 2.8 Plantilla de unisel (1m²) utilizada para la siembra en campo.



Seis semanas posteriores al trasplante en el sitio experimental (Imagen 2.9), se prosiguió a la aplicación de los AOBPM al suelo con el fin de aumentar la biodisponibilidad de los metales pesados para el proceso de fitoextracción.

2.4.1 Germinación y Cultivo de Plantas.

Se sembraron 6 charolas de propagación de 200 pocillos acondicionadas con Peat-moss con semillas de la planta que dio mejores resultados en pruebas anteriores. Se humedeció de manera que la consistencia permitiera el óptimo crecimiento de la planta y la cantidad de agua fuera la adecuada para saturar el sustrato. Se introdujo el Peat-moss de manera unitaria en cada uno de los pozos de las charolas para después colocar de manera superficial las semillas y ser cubierta por vermiculita, sustrato que permite la correcta aireación y la emergencia adecuada de la planta.

Se cubrieron las charolas sembradas con plástico negro para evitar la desecación. Una vez ocurrida la emergencia, se llevaron las charolas dentro del

invernadero y se continuo el cultivo de las plantas por espacio de 3 semanas monitoreando su crecimiento y la humedad del suelo (**Kumar *et al.*, 1995**).

2.4.2 Experimento Bajo Condiciones Controladas.

Se prepararon 20 macetas con 800 g de suelo contaminado, en cada una de ellas se trasplantaron 2 plantas de mostaza registrándose su altura (cm) y el número de hojas. Se prepararon 5 tratamientos con 4 repeticiones incluyendo un control con agua destilada.

Las plantas se cultivaron por 6 semanas antes de aplicar el tratamiento con los AOBPM, esto para permitir el crecimiento de las raíces de las plantas y alcanzar a cubrir la mayor cantidad de suelo posible asegurando el contacto de las raíces con los metales contaminantes.

Los tratamientos fueron los siguientes: 50 y 100 mmoles/kg de dos diferentes AOBPM.

Al terminar la aplicación de los tratamientos las plantas se dejaron crecer por un periodo de 10 días más para que se llevara a cabo la acumulación de metales por las plantas. Se cosecharon las plantas, se determinaron los pesos fresco y seco y se llevó a cabo la metodología descrita para la extracción de los metales y su cuantificación.

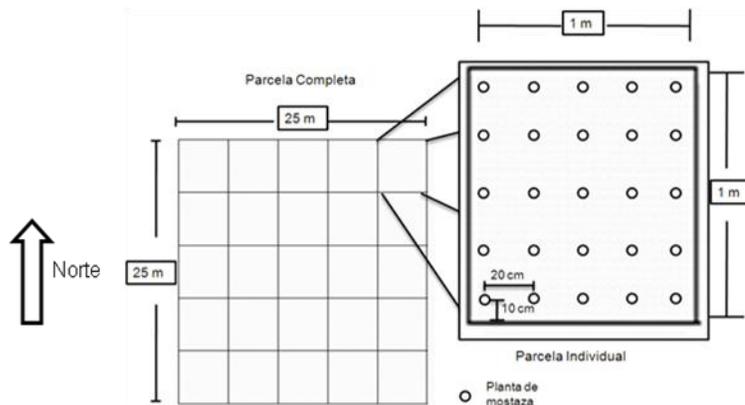
2.4.3 Experimento en Campo.

El primero paso para este experimento consistió en una intensa limpieza del sitio de estudio, es decir, la remoción manual de toda clase de basura, piedras,

escombro, ramas, etc., así como el desmonte de malezas presentes en el sitio elegido entre las 3 zonas descritas en la Sección 2.2.2.

El área para el crecimiento de las plantas consiste en un cuadrante de 25 m² divididos en 25 parcelas de 1 m² cada una. Las parcelas se delimitaron utilizando estacas de madera atando cuerdas a cada extremo de ellas. En cada una de las 25 parcelas se trasplantaron 25 plantas. La distancia entre las cuerdas y la primera planta fue de 10 cm y la distancia entre plantas fue de 20 cm. Se sembraron de esta manera para asegurar cubrir todo la zona teniendo un espacio entre planta y planta de 20 cm (Imagen 2.5).

Imagen 2.5 Zona experimental para prueba piloto de fitoextracción.



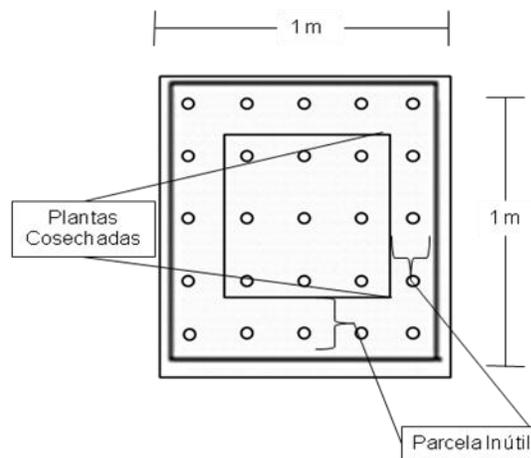
Las plantas se desarrollaron durante 6 semanas antes de la aplicación de los AOBPM para permitir el crecimiento adecuado de las raíces. Durante este periodo se mantuvo el suelo con una humedad cercana al 80% CC.

Al terminar el tiempo de enraizamiento de las plantas, el suelo fue tratado con los AOBPM (séptima semana), se aplicó una sola dosis de 2 ácidos de manera individual (málico y cítrico) a 2 concentraciones (50 mmoles/kg y 100 mmoles/kg) y un blanco irrigado solamente con agua. Se aplicaron un total de 5

tratamientos a 5 repeticiones. La asignación de las parcelas para cada tratamiento fue completamente al azar mediante la generación de números aleatorios usando MS EXCEL.

El crecimiento de las plantas continuó 10 después de la aplicación de los AOBPM basado en los resultados de la Sección 2.3.3. Posteriormente se cosecharon las partes aéreas de las 9 plantas interiores de cada una de las parcelas, tal como lo muestra la Imagen 2.6. Estas plantas se consideraron como una sola muestra, es decir se generaron 25 muestras, una de cada unidad experimental. Se determinó el peso fresco y seco, y se determinó la cantidad de metales aplicando la metodología descrita anteriormente.

Imagen 2.6 Muestreo de las plantas de la prueba piloto en campo.



Mediante este diseño experimental se descartó lo que agrónomicamente se conoce como "Parcela Inútil", lo cual es el espacio ocupado por las plantas circundantes próximas entre parcelas ya pudieran presentar un doble efecto experimental por estar expuestas a los tratamientos de parcelas vecinas, lo cual podría causar errores experimentales.

A cada una de las muestras generadas en las parcelas se les determinó el factor de remediación (FR), que es el potencial que tienen las plantas para la fitoextracción (Vyslouzilova *et al.*, 2003, Komarek *et al.*, 2007). Esto se calculó utilizando la ecuación (5) (modificada de Komarek *et al.*, 2007):

$$FR = \frac{(MP \text{ en planta})(B i o m a s a)}{(MP \text{ en suelo})(S u e l o)} \times 100 \quad (5)$$

donde FR es el factor de remediación (%), MP en planta es la cantidad de metal pesado en las partes cosechables de la planta en biomasa seca ($\mu\text{g/g}$), Biomasa es el peso seco de la biomasa (g), MP en suelo es la cantidad de metal pesado en suelo ($\mu\text{g/g}$) y Suelo es la cantidad de suelo a remediar (g). Acorde a la ecuación (4), mientras mayor sea el FR es mejor la predicción de la remediación (Zhuang *et al.*, 2005, Zhao *et al.*, 2003).

Se calculó además el factor de bioconcentración (FBC) que es uno de los factores clave para la eficiencia de la fitoextracción. El FBC se refiere a la capacidad de la planta de extraer el metal, movilizarlo en su tejido y almacenarlo en su biomasa (McGrath *et al.*, 2004). El FBC se calculó utilizando la ecuación (6) (modificada de Mench *et al.*, 2010):

$$FBC = \frac{MP \text{ en planta}}{MP \text{ en suelo}} \quad (6)$$

donde FBC es el factor de bioconcentración, MP en planta es la cantidad de metal pesado en la biomasa seca cosechable de la planta (mg/kg) y MP en suelo es la cantidad total de metal pesado en el suelo a remediar (mg/kg).

2.5 Control de Calidad de Datos.

Para asegurar la calidad de los datos experimentales, los análisis se llevaron utilizando réplicas (2-6). En el caso de las determinaciones de los parámetros fisicoquímicos de las muestras se analizaron estadísticamente los resultados asegurando una variación no mayor de $\pm 10\%$ entre las muestras. Para el caso de las determinaciones analíticas de EEA, se crearon estándares de calidad con concentraciones conocidas de metales y se insertaban al azar en el análisis asegurando una lectura adecuada y precisa de las absorciones registradas. De igual manera, se realizaron análisis estadísticos para minimizar los errores producidos durante las determinaciones. Además, en cada determinación se corrían blancos para asegurar el control analítico de los experimentos.

2.6 Análisis Estadístico.

Para evaluar los efectos experimentales incluidos en este proyecto se utilizó el diseño experimental de bloques completamente al azar. Los datos experimentales obtenidos según su caso, fueron analizados con las pruebas de normalidad de Kolgomorov-Smirnov o Anderson-Darling, utilizando el programa ASISSTAT, de acuerdo al número de réplicas experimentales. Posteriormente estas variables se analizaron usando un análisis de varianza ANOVA (ó Tukey) ó la prueba de Kruskal-Wallis (en el caso de que la distribución de los datos no sea normal). La comparación de medias se realizó por la diferencia mínima significativa (DMS).

CAPITULO 3

3 RESULTADOS Y DISCUSIONES.

3.1 Suelo

3.1.1 Muestreo.

El objetivo principal de muestrear 3 zonas diferentes dentro del sitio contaminado fue primeramente determinar la contaminación presente en el sitio de estudio, además de determinar la zona donde la contaminación fuera la mayor, ya que la distribución de metales pesados en un sitio contaminado puede variar de una zona a otra (**Qiao et al., 2010, Robinson et al. 2003**).

La necesidad de formar las muestras compuestas a partir de las puntuales fue asegurar la homogeneidad de las muestras. Los análisis de suelo en laboratorio generalmente requieren gramos de suelo (**Reetz 2001**), es por esto que la muestra tomada debe ser representativa.

3.1.2 Análisis de las Muestras Colectadas.

La Tabla 3.1 resume los resultados obtenidos de algunos de los análisis efectuados.

Tabla 3.1 Resultados de algunos parámetros fisicoquímicos del suelo del área de estudio.

Zona de Muestreo	Textura	pH	%Materia Orgánica	%Capacidad de Campo	%Humedad
1	FAR	7.94 ± 0.02	7.60 ± 0.20	56.1 ± 0.80	6.53 ± 0.30
2	FAR	7.87 ± 0.01	11.1 ± 0.10	73.0 ± 0.60	4.67 ± 0.40

3	F	7.66 ± 0.00	24.0 ± 0.10	60.0 ± 1.50	3.12 ± 0.50
Recomendable*	----	6.60 – 7.30	≥1.60	30.0 – 40.0	6.00 – 8.00

Resultados promedio ($n=2 \pm$ error estándar), FAR: franco arcilloso, F: franco, Según la NOM-147.

Debido a que el análisis de la textura del suelo arroja datos tanto cualitativos como cuantitativos (Tabla 3.1), es necesario mencionar los datos cuantitativos obtenidos en esta prueba y la manera en la que se llegó a la determinación de cada tipo de suelo (Tabla 3.2).

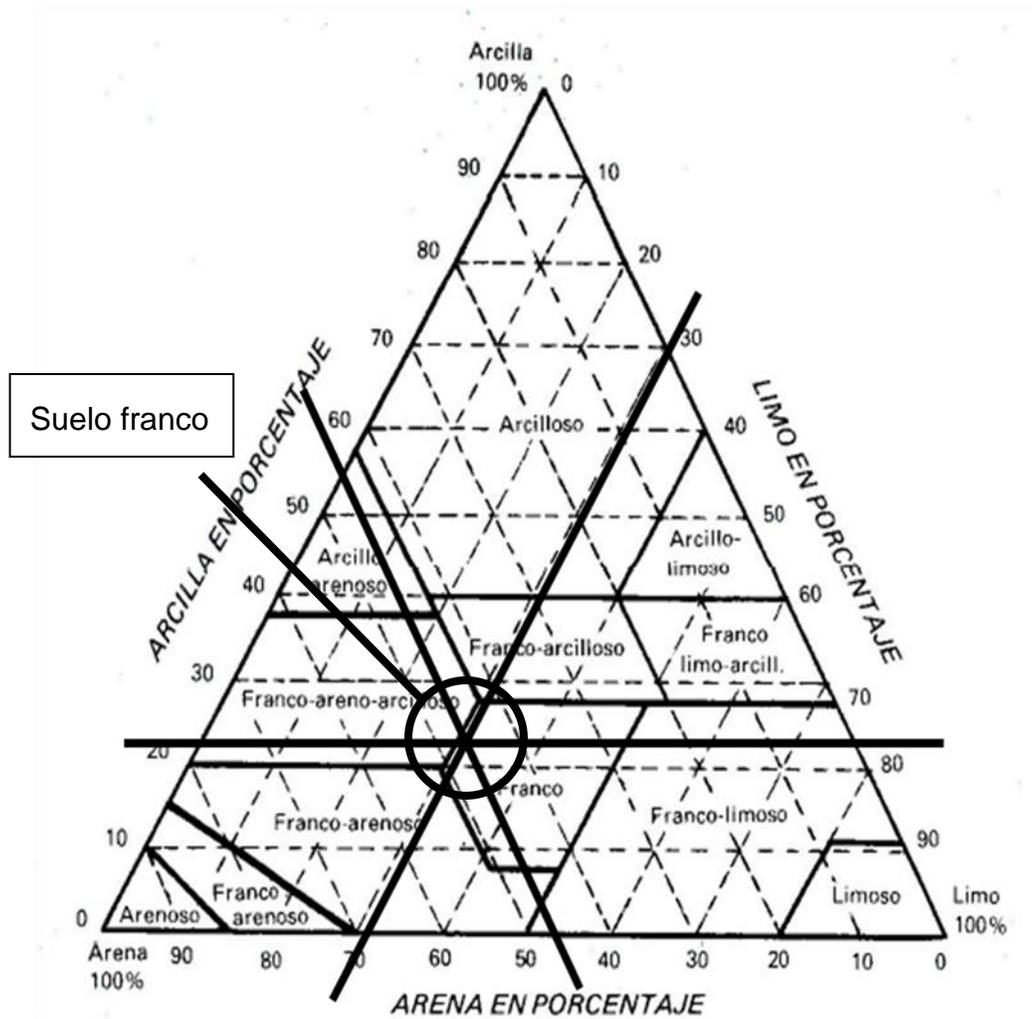
Tabla 3.2 Análisis de textura.

Zona de Muestreo	Lectura Corregida 1	Lectura Corregida 2	% Arena	% Arcilla	% Limo
1	28.9 ± 3.32	13.3 ± 2.00	42.1 ± 6.64	26.5 ± 4.00	31.4 ± 2.64
2	32.4 ± 1.17	16.3 ± 0.00	35.1 ± 2.34	32.5 ± 0.00	32.3 ± 2.34
3	26.9 ± 1.33	11.9 ± 1.00	46.1 ± 2.66	23.8 ± 2.00	30.1 ± 0.66

Resultados promedio ($n=2 \pm$ error estándar). Temperatura constante a 23°C.

En base a estos resultados se procedió a trazar las líneas correspondientes en el Triángulo de texturas mencionado anteriormente (Imagen 3.1).

Imagen 3.1 Determinación de la clase textural de suelo correspondiente a la zona de muestreo 3.



El suelo de las zonas 1 y 2 (FAR), al tener una cantidad mayor de partículas arcillosas dentro de su composición, lo hacen un suelo más propicio a la compactación, en comparación con el suelo de la zona 3 (F), que al no ser tan susceptible a la compactación, permite una mayor filtración del agua a través de él, así como una mayor aeración del suelo (Keller, 2006). Estas características ayudaron a definir el lugar óptimo para el cultivo de las especies vegetales y poder cumplir de manera satisfactoria con los objetivos del presente trabajo.

El pH óptimo para el desarrollo de las especies vegetales en un suelo es, de acuerdo a la legislación mexicana, entre un valor de 6.6 a 7.3. Los valores de pH obtenidos están por encima de este rango óptimo clasificándose como ligeramente alcalino. La basicidad del suelo analizado se puede deber a la región geográfica del mismo, ya que se tienen reportes de que en regiones con escasez de agua y con poca actividad biológica predominan estas condiciones de pH en el suelo (**Ibáñez, 2007**).

Para el caso de la materia orgánica, el valor más alto fue el del sitio 3 y el más bajo fue el del sitio 1. El valor de 24% es el más adecuado para el cultivo de plantas de acuerdo a la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004.

Los valores obtenidos de la capacidad de campo (56% – 73%) están por encima del rango de 30% – 40% considerado como normal. Es importante mencionar que el tipo de suelo con el que se está trabajando es en general del tipo franco arcilloso, además que la cantidad de materia orgánica es alta, lo que explicaría la alta retención de agua por el suelo y la baja capacidad del agua de filtrarse a través del mismo (**Keller, 2006**).

El suelo de estudio se reporta como contaminado con metales pesados por lo tanto la poca movilidad del agua es un factor importante a considerar, ya que se vería hasta cierto punto reducida la movilidad de los metales a través del suelo, Lo cual es un factor favorable para disminuir la contaminación subsecuente mediante la lixiviación de los metales (**Keller, 2006**).

La variación de la humedad depende de la temporada en la que se toma la muestra. Si es temporada de lluvias, el porcentaje estará por encima de los

valores recomendados para suelo agrícola por la regulación mexicana. En comparación, si las muestras son colectadas en temporadas de sequia los valores encontrados en el suelo disminuirán. La Tabla 3.3 enlista los valores encontrados en el análisis de la CIC de las muestras colectadas.

Tabla 3.3 Análisis de la Capacidad de Intercambio Catiónico.

Zona de Muestreo	CIC (meq/kg)			
	Na	Ca	Mg	K
1	0.31 ± 0.01	2.20 ± 0.07	0.99 ± 0.16	0.40 ± 0.002
2	0.05 ± 0.03	2.63 ± 0.06	1.06 ± 0.12	0.59 ± 0.01
3	0.01 ± 0.004	3.32 ± 0.07	1.14 ± 0.16	0.50 ± 0.008

meq: miliequivalentes, resultados promedio (n=2 ± error estándar).

Los resultados obtenidos muestran que el suelo tiene una baja CIC. Esto se puede explicar en parte por el pH de la zona, ya que según se tienen datos, la CIC aumenta conforme aumenta el pH.

Según Beldin S. I. *et al.* (2007) existen dos tipos de materia orgánica la fracción ligera y la fracción pesada. La primera contribuye en menor medida a la CIC. Partiendo de esta aseveración, la materia orgánica presente en el sitio es probablemente del tipo fracción ligera.

Los resultados obtenidos de los análisis fisicoquímicos del suelo indicaron cuál sería el sitio ideal para las siguientes fases experimentales. Sin embargo, el criterio principal de selección fué el contenido de metales lo cual se muestra en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4 Concentración de metales totales en suelo.

Zona de Muestreo	Concentración de Metales (mg/kg)		
	Ni	Pb	Zn
1	0.69 ± 0.51	78.8 ± 2.4	6341 ± 345
2	DL	59.0 ± 4.53	4464 ± 202
3	3.12 ± 0.97	153 ± 3.81	5113 ± 140

DL: debajo del límite de detección, resultados promedio ($n=6 \pm$ error estándar)

Se analizaron además Cd, Cr y As, sin encontrar cantidades consideradas contaminantes en el suelo estudiado.

Los valores de Ni en el suelo se encontraron por debajo del límite establecido como toxico (**NOM-147**), solo para el caso de la zona 2, la cantidad de Ni está incluso por debajo del límite de detección del método.

Aunque las concentraciones de Pb en el suelo estudiado cumplen los requerimientos de las regulaciones en México y los EUA, algunos regulaciones de países de la Unión Europea (e.g. Francia, Alemania, Italia (**Directiva 86/278/EEC**)) son más estrictas y manejan LMP de solo 100 mg/kg de este metal.

Los niveles de Zn en las tres zonas de muestreo, resultaron por encima de lo permitido tanto por la legislación nacional e internacional, en este sentido, este metal fue considerado como objetivo principal para la remediación del sitio.

3.2 Pruebas Preliminares.

La zona seleccionada de acuerdo a las pruebas fisicoquímicas realizadas a las tres zonas de muestreo fue la número 3, ya que al ser un suelo franco, con un pH más cercano a la neutralidad y la alta cantidad de materia orgánica, es más

factible el soporte de vida vegetal en el (**Keller, 2006**). Además, el hecho de presentar contaminación por metales pesados y ser una área marginal y abandonada hace a este sitio de estudio un buen objetivo para la fitoextracción (**Schroder et al., 2009, Solhi et al., 2005, Koopmans et al., 2007**).

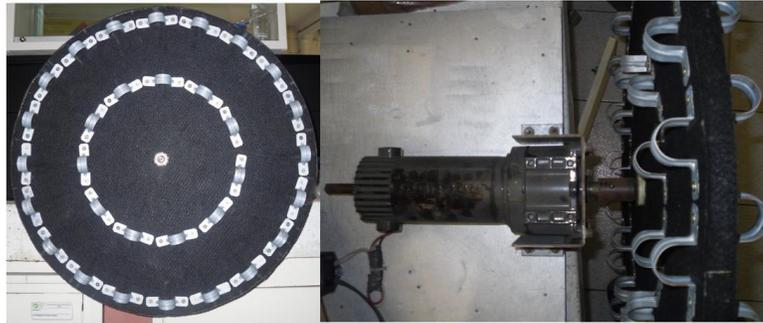
3.2.1 Pruebas de Solubilidad de Metales Pesados por AOBPM.

El objetivo principal de llevar a cabo este experimento fue determinar la cantidad de metales en la solución de suelo tras el tratamiento con los 9 diferentes AOBPM, ya que según se tienen reportes, la cantidad de metales que puede acumular una planta está directamente relacionado con la cantidad del metal presente en la solución (*i.e.* biodisponible) (**Robinson et al., 2003, Lestan et al., 2006, Fassler et al., 2010, Ulery et al., 2008, Liu et al., 2008, do Nascimento et al., 2006**).

Varias muestras mostraron que las condiciones adecuadas de centrifugado de los tubos Falcon con los tratamientos de suelo fueron las siguientes: 2500 rpm por un tiempo de 6 minutos (método modificado de **Ulery et al., 2008** y **Liu et al., 2008**).

El diseño y construcción del equipo mezclador se logró mediante el acoplamiento de un moto-reductor adquirido en un centro de distribución de la ZMM y tabla circular previamente acondicionada con sujetadores para 62 tubos Falcon. La velocidad de rotación puede regularse de 0 a 56 rpm.

Imagen 3.2 Equipo diseñado para la mezcla vertical.



El uso de este equipo permitió la completa mezcla del suelo con la solución de los diferentes AOBPM. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.1.

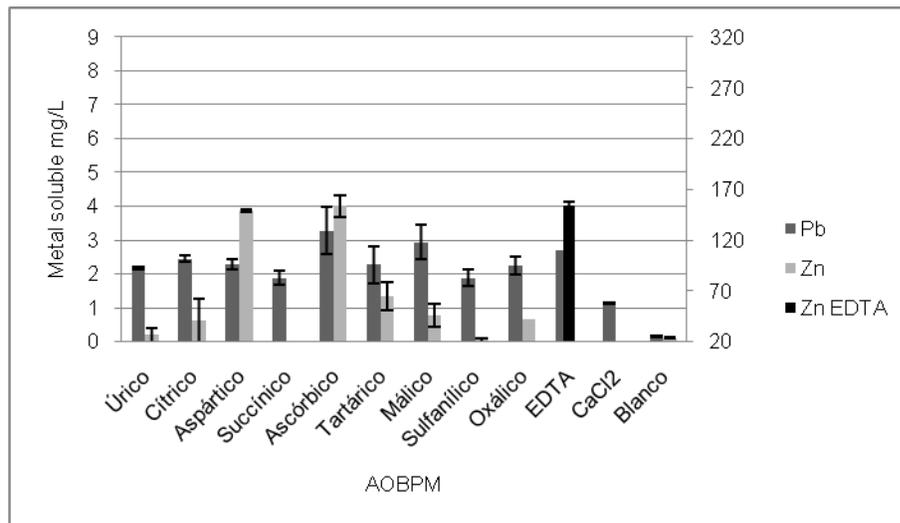


Figura 3.1 Fracción metálica soluble por los AOBPM a una concentración de 10 mmoles/kg. Los valores graficados en la línea secundaria representan la fracción metálica de Zn extraída por efecto del EDTA a 50 mmoles/kg. Resultados promedio ($n=2$). Líneas indican barras de error estándar.

De igual manera la Figura 3.2 nos expone los resultados de la fracción metálica soluble en los AOBPM de 50 mmoles/kg.

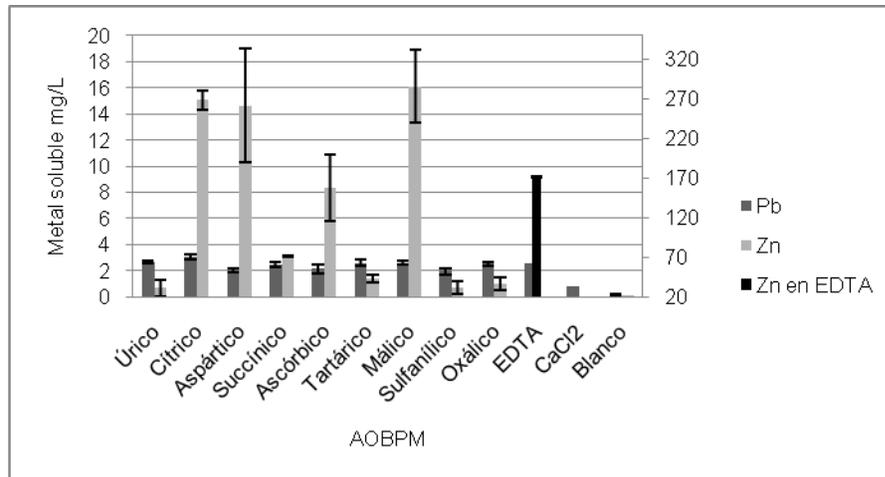


Figura 3.2 Fracción metálica soluble por los AOBPM a una concentración de 50 mmoles/kg. Los valores graficados en la línea secundaria representan la fracción metálica de Zn extraída por efecto del EDTA a 100 mM. Resultados promedio (n=2). Líneas indican barras de error estándar.

Los resultados obtenidos para el caso de las fracciones metálicas de Pb con los AOBPM a 10 mmoles/kg no mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre ellos ni en relación con el EDTA o el CaCl_2 . Este resultado nos indica que el efecto en el grado de acomplejamiento es aparentemente el mismo para los diferentes ácidos. Sin embargo es posible observar una marcada diferencia ($p < 0.05$) entre los tratamientos con los AOBPM al suelo en comparación con la aplicación de solo agua destilada, esto nos sugiere que los AOBPM investigados aumentaron la solubilidad de los metales.

Para el caso del Zn, el único tratamiento que mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) fue el tratamiento con el EDTA (307 mg/L a 10 mmoles/kg y 342 mg/L a 50 mmoles/kg) (Figura 3.1 y 3.2) esto se puede deber a la afinidad que tiene este metal con el agente secuestrante (K_f 16.68) (Ulery *et al.*, 2008). Además,

los ácidos aspártico, cítrico y málico mostraron un mayor efecto ($p < 0.05$) en la solubilidad de los metales en comparación con los demás AOBPM.

Los resultados del presente estudio confirman lo reportado por Ulery A. L. *et al.* (2008), Liu D. *et al.* (2008) y do Nascimento C. W. A. *et al.* (2006) quienes encontraron bajos niveles de acomplejamiento de los metales (Pb y Zn) con los ácidos ascórbico, oxálico y tartárico. Además, los ácidos succínico, sulfanílico y úrico mostraron también un bajo efecto en la solubilidad de los metales en las dos concentraciones aplicadas al suelo en el presente estudio.

De acuerdo con el estudio realizado por Ulery A. L. *et al.* (2008), los agentes acomplejantes como el EDTA tienen la capacidad de solubilizar una mayor cantidad de Pb, sin embargo, las formas químicas en las que se presenta este metal juegan un papel importante en la capacidad de los acomplejantes. En suelos donde las formas químicas son del tipo hidrocersuita ($Pb_3(CO_3)_2(OH)_2$) óxido de plomo II (PbO) y laurionita (PbClOH) se facilita en gran medida la solubilidad del metal por los acomplejantes. En suelos con formas químicas de plomo tales como tetra óxido de plomo (Pb_3O_4), carbonato de plomo ($PbCO_3$), sulfato de plomo ($PbSO_4$), cromato de plomo ($PbCrO_4$) y silicato de plomo ($PbSiO_3$) el efecto de los acomplejantes decae en gran medida (Cui *et al.*, 2004, Robinson *et al.*, 2003).

Las cantidades solubilizado de Pb del suelo por el ácido cítrico en el estudio de Ulery A. L. *et al.* (2008) (4%) donde predominaron formas químicas solubles y las encontradas por Liu D. *et al.* (2008) con EDTA (34%) son mucho mayores en comparación con las obtenidas en el presente trabajo (Figura 3.1 y 3.2). Esto

se debe probablemente a que las especies químicas de Pb presentes en el suelo de estudio son del tipo no solubles. Como se observa en la Figura 3.2, el ácido málico exhibió a su vez capacidades de extraer Pb similares a las encontradas por Ulery A. L. *et al.* (2008) donde la cantidad solubilizada fue de alrededor de 10 mg/L. La concentración de Pb solubilizada por efecto del ácido cítrico en el presente estudio (Figura 3.1 y 3.2) son similares a los solubilizada por do Nascimento C. W. A. *et al.* (2006), (5 mg Pb/L) sugiriendo el bajo potencial de este ácido en la solubilidad del Pb.

Para el caso del Zn (Figura 3.2), do Nascimento C. W. A. *et al.* (2006) obtuvo concentraciones menores (10 mg/L) de Zn soluble por efectos del ácido cítrico en comparación con las del presente estudio (30.2 mg/L). Esto puede deberse principalmente a las diferencias entre las concentraciones de Zn presentes en ambos estudios, do Nascimento C. W. A. *et al.* (2006) encontró concentraciones totales de 85 mg/kg de Zn mientras que en el presente estudio las cantidades superan las 4000 mg/kg.

Los ácidos que indujeron un mayor grado de solubilidad y que presentaron una mayor diferencia significativa ($p < 0.05$) en el caso del Zn y a la concentración de 50 mM son el aspártico, cítrico y málico (29.3 mg/L, 30.6 mg/L y 32.2 mg/L respectivamente (Figura 3.2), valores que según la OIS (0.5 mg/L) (Swiss Federal Ordinance Relating to Impacts on the Soil 1998) pueden tener un efecto adverso tanto en la calidad del ambiente y en la agricultura (Fassler *et al.*, 2010).

Tomando en cuenta los resultados anteriores y la facilidad en la adquisición de los reactivos en cantidades industriales con el fin de sustentar el presente estudio como económicamente viable, se seleccionaron solamente dos AOBPM para las siguientes fases experimentales, estos fueron el ácido cítrico y el ácido málico.

3.2.2 Pruebas de Adaptación y Tolerancia.

Como ya se mencionó antes, las plantas ideales a utilizar en un proceso de fitoextracción dependen en gran medida de su tolerancia a la toxicidad de los metales en suelos (Robinson *et al.*, 2003, Zhuang *et al.*, 2005, Zhuang *et al.*, 2007, Keller *et al.*, 2002, Korenkov *et al.*, 2007). La determinación de esta capacidad en las plantas fue uno de los objetivos de este experimento (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Producción de biomasa seca a los diferentes tratamientos de suelo de las 4 especies vegetales analizadas tras 4 semanas de cultivo ($p < 0.05$).

Niveles de Contaminación	Especie Vegetal (g)			
	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Brassica juncea</i>	<i>Zea mays</i> Asgrow	<i>Zea mays</i> regional
Blanco	0.07 ^{b,a} ± 0.01	0.17 ^{b,ab} ± 0.08	0.37 ^{b,c} ± 0.02	1.06 ^{a,ab} ± 0.01
100%	0.013 ^{c,b} ± 0.001	0.22 ^{bc,ab} ± 0.07	0.82 ^{ab,bc} ± 0.06	1.20 ^{a,a} ± 0.16
80%	0.02 ^{b,b} ± 0.001	0.10 ^{b,b} ± 0.03	0.83 ^{a,b} ± 0.18	0.07 ^{b,c} ± 0.02
60%	0.03 ^{b,b} ± 0.002	0.27 ^{b,a} ± 0.08	1.38 ^{a,a} ± 0.05	0.15 ^{b,b} ± 0.01

Resultados promedio ($n=2 \pm$ error estándar). Valores seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente. Letras antes de la coma corresponden a la comparación de medias entre plantas, letras después de la coma corresponden a la comparación de medias entre niveles de contaminación.

La producción de biomasa generada por las plantas resultó baja (Tabla 3.5), sin embargo la biomasa producida por el tabaco es consistente con los resultados obtenidos por Korenkov V. *et al.* (2007) quienes obtuvieron una producción menor a 0.1g. El tiempo de cultivo de estas plantas fue para todas de 4 semanas contando desde el primer día de siembra hasta la fecha de su cosecha. Se determinó este periodo de tiempo ya que para el proceso de fitoextracción asistida las plantas idealmente deben de tener un tiempo de crecimiento adecuado (Angelova *et al.*, 2009, Maxted *et al.*, 2007, Korenkov *et al.*, 2007). La emergencia de las plántulas (*i.e.* salida del suelo) ocurrió a la semana para la mayoría de los especies. Solamente las plantas de tabaco tardaron alrededor de 9 días en emerger del suelo.

Las plantas que dieron una mejor producción de biomasa fueron las dos especies de maíz (Tabla 3.5), esto se puede deber al tamaño de la semilla (maíz, ambas variedades 1cm; mostaza 3 mm; tabaco ≤ 1 mm). La producción de biomasa fue 20 veces más elevada en promedio para el maíz regional comparado con el tabaco (Tabla 3.5). La cantidad de biomasa producida por el maíz regional fue de solo 3 veces superior a la mostaza (Tabla 3.5) sugiriendo la capacidad de ambas especies de crecer en suelos con metales.

El maíz Asgrow en el suelo acondicionado a un 60% de contaminación fue el que produjo una mayor biomasa, el maíz regional produjo cantidades comparables estadísticamente en el suelo sin acondicionar (100%) (Tabla 3.5). En general, y asumiendo que no se realice ningún acondicionamiento del suelo en estudio para la prueba piloto de fitoextracción debido al costo que esto

acarrea (**Ulery et al., 2008**), la planta con el potencial más elevado de producción de biomasa es el maíz regional (Tabla 3.5). *Zea mays*, tiene además la ventaja de ser una planta nativa acostumbrada a las condiciones climáticas de la zona, representando esto una ventaja comparada con otras plantas (**Fassler et al., 2010**).

El tabaco, como se esperaba bajo las condiciones de siembra fue la planta de menor producción de biomasa (0.07 g biomasa seca del blanco) (Tabla 3.5) ya que es una planta de lento crecimiento inicial, estos resultados son equiparables a los reportados por Korenkov V. et al. (2007) quienes obtuvieron, tras 1 semana de pre-crecimiento de la plantas seguido por un cultivo en suelo de 4 semanas, una cantidad de biomasa seca de ≤ 0.2 g en sus plantas blanco.

Otro punto importante para la selección de la planta es su capacidad de tomar metales del suelo, es decir, que trabaje como una “bio-bomba extractora” (**Robinson et al., 2003**), lo cual representa el factor determinante en la fitoextracción (**Zhuang et al., 2007, Keller et al., 2002, Korenkov et al., 2007, Evangelou et al., 2006, Cui et al., 2004**). Además otros criterios importantes a considerar son biomasa producida, así como la estación climática del año al momento del montaje del programa de fitoextracción (**Keller et al., 2002**). La Tabla 3.6 expone resultados obtenidos después del análisis de metales totales en plantas.

Tabla 3.6 Concentración de Pb y Zn en las especies vegetales analizadas a 100% contaminación ($p < 0.001$).

Especie Vegetal	Suelo sin acondicionar	
	Pb (mg/kg)	Zn (mg/kg)
<i>Nicotiana tabacum</i>	1.30 ^{ab} ± 0.63	12.6 ^a ± 0.01
<i>Brassica juncea</i>	0.84 ^{bc} ± 0.26	11.5 ^a ± 3.71
<i>Zea mays</i> Asgrow	2.00 ^a ± 0.74	0.98 ^a ± 0.37
<i>Zea mays</i> Regional	0.68 ^{cd} ± 0.22	6.97 ^a ± 0.31

Resultados promedio ($n=2 \pm$ error estándar) Valores seguidos por la misma letra no corresponden a la comparación de medias entre plantas.

Es importante recordar que la acumulación de metales está en función de la cantidad del metal presente en solución en el suelo (*i.e.* la fracción potencialmente biodisponible) (Robinson *et al.*, 2003, Lestan 2006, Fassler *et al.*, 2010, Ulery *et al.*, 2008, Liu *et al.*, 2008, do Nascimento *et al.*, 2006).

Schroder P. *et al.* (2009) explican que generalmente hay una buena correlación entre la acumulación de los metales en solución en el suelo por parte de las plantas, por lo tanto, el hecho de que la cantidad de metales solubilizados por el agua sea de 0.28 mg/L para el caso del Pb y de 0.22 mg/L para el Zn (Figura 3.2) en el presente estudio explica la baja acumulación por las plantas estudiadas.

Los resultados obtenidos en la acumulación de Pb en las cuatro especies vegetales (Tabla 3.6) son similares a los encontrados por Ulery A. L. *et al.* (2008) donde evaluaron la capacidad de acumulación de mostaza india, girasol y una variedad de zacate (festuca alta) encontrando acumulaciones menores a 10 mg/kg (peso seco) en todos los controles (agua destilada). Es importante

mencionar que Ulery A. L. *et al.* (2008) encontraron que la cantidad de metal extraíble por efecto del agua destilada era prácticamente insignificante (<1mg/L).

Evangelou M. W. *et al.* (2006) demostraron que los niveles de acumulación de Pb en tabaco son bajos (≤ 10 mg/kg) sin la aplicación de algunos agentes acomplejantes (*e.g.* EDTA, ácido cítrico, ácido oxálico). Lesage E. *et al.* (2005) observaron el mismo fenómeno en plantas de girasol. Dichos resultados son equiparables a los del presente estudio donde la acumulación de Pb en el tabaco fue de 1.3 mg/kg (Tabla 3.6). Estos resultados se afianzan aún mas ya que incluso plantas hiperacumuladoras (*e.g.* *Thlaspi. caerulescens*) acumulan poco Pb (13 mg/kg) (Koopmans *et al.*, 2007).

La baja acumulación de Pb en las cuatro especies vegetales se puede explicar debido a la baja biodisponibilidad que generalmente presenta este metal en el suelo, además, esto se ha reportado incluso aplicando agentes secuestrantes al suelo (Evangelou *et al.*, 2006).

Otra explicación de la baja biodisponibilidad del Pb en suelo para fines de remediación es el tipo de suelo, ya que según Lestan D. *et al.* (2006), algunas plantas hiperacumuladoras (*e.g.* *T. caerulescens*) están limitadas a ciertos tipos de suelos.

La cantidad de Zn extraída por la mostaza no difiere estadísticamente de las demás ($p>0.05$), siendo esta cantidad una de las más elevadas en las 4 especies vegetales evaluadas (Tabla 3.6). Estudios realizados por diversos autores (Ulery *et al.*, 2008, Mench *et al.*, 2010) demuestran que la aplicación

de agentes acomplejantes (e.g. EDTA, ácido cítrico) puede aumentar significativamente la acumulación de Zn por las plantas ya que aumenta la cantidad de metal en solución en suelo.

En el estudio realizado por Wenzel W. W. *et al.* (2003), donde la cantidad de Zn solubilizada en sus controles fue aproximadamente 2 mg/L a partir de una concentración de 344 mg/kg de Zn total, obtuvo acumulaciones de 59 mg/kg de Zn en plantas de canola control, mientras que en el presente estudio se obtuvieron concentraciones de 11.5 mg/kg. Estos resultados indican el potencial que puede tener *Brassica juncea* utilizada en el presente experimento en el proceso de fitoextracción.

Zhuang P. *et al.* (2007) trabajaron con la hiperacumuladora de Zn *Sedum alfredii* (Chao *et al.*, 2008, Lui *et al.*, 2007, Wu *et al.*, 2007) en un suelo con arriba de 1000 mg/kg de Zn total y una solubilidad de 93 mg/L, la cantidad de Zn acumulada por la planta fue de apenas 50 mg/kg mientras que la cantidad de Zn acumulada por el tabaco y la mostaza, en el presente estudio, fue de 12.6 mg/kg y 11.5 mg/kg respectivamente. La acumulación de Zn, en el presente estudio, resultó muy lejana a los criterios de hiperacumulación (Tabla 1.6) a estas condiciones. Esto sugiere que es necesario continuar investigando el uso de quelantes como complemento a los procesos de fitoextracción.

De acuerdo a los resultados de la Tabla 3.6, las especies con mejores resultados para la fitoextracción son la mostaza y el tabaco, sin embargo, debido a la estación del año en la que se montó el experimento (invierno), se

descartó el uso del tabaco y se continuó solamente con la mostaza ya que es una planta invernal.

3.2.3 Pruebas Indirectas de Degradación de AOBPM.

Las fases anteriores permitieron hacer la selección de la especie vegetal a utilizar (mostaza). Además, debido al costo que representa la adquisición del ácido aspártico (12 USD/kilo) y el potencial que presentan el ácido cítrico (2.5 USD/kilo) y el málico (4.3 USD/kilo) en la solubilidad de los metales, se seleccionaron estos últimos para los experimentos (**Ulery et al., 2008, do Nascimento et al., 2006, Liu et al., 2008**).

En esta serie de experimentos se pretendió determinar el efecto de los AOBPM solubilizando los metales en función del tiempo y de esta manera determinar el tiempo de acción de cada uno de los ácidos, ya que se tiene reportes de que los AOBPM tienden a ser bio-degradados o mineralizados por efecto de los microorganismos presentes en el suelo (**do Nascimento et al., 2006, Van Hess et al., 2003, Melo et al., 2008**). Incluso, se ha reportado la degradación de 1/3 de la cantidad de ácido cítrico adicionado al suelo tras un periodo de 24 h (**Melo et al., 2008**).

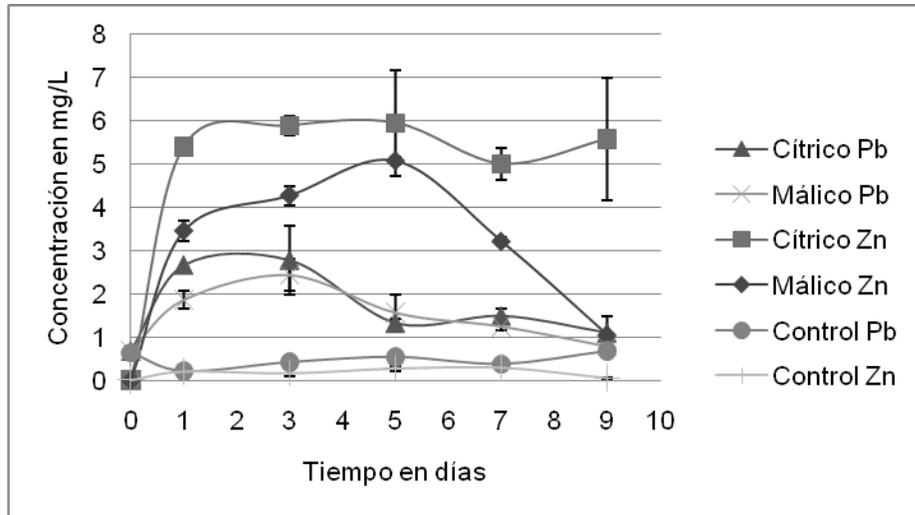


Figura 3.3 Efecto en la solubilidad de Pb y Zn en el suelo de estudio por la adición de los AOBPM a una concentración de 50 mmoles/kg. Líneas indican barras de error estándar.

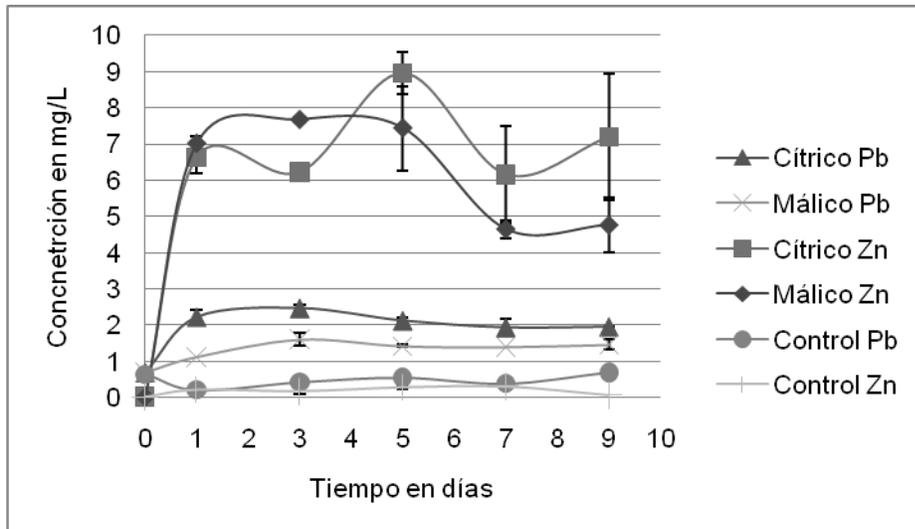


Figura 3.4 Efecto en la solubilidad de Pb y Zn en el suelo de estudio por la adición de los AOBPM a una concentración de 100 mmoles/kg. Líneas indican barras de error estándar.

El análisis estadístico no reveló una diferencia significativa ($p > 0.05$) de las concentraciones de Pb y Zn solubilizadas en los diferentes tiempos por el ácido cítrico a 100 mmoles/kg, el mismo comportamiento se presentó para el ácido

cítrico a 50 mmoles/kg para el Zn soluble (Figura 3.3). Para el caso del ácido málico a 100 mmoles/kg el análisis estadístico ($p < 0.01$) reveló una máxima solubilidad de Zn y Pb al día 3, presentando una disminución gradual en función del tiempo (**Liu et al., 2008**). Hallazgos similares fueron reportados por Evangelou M. W. et al. (2006), quienes para el caso del ácido tartárico y oxálico encuentran picos máximos de movilidad de Pb.

El ácido málico a 50 mmoles/kg alcanzó un máximo de solubilidad al día 3 tanto para Pb y Zn (Figura 3.3), posteriormente la concentración disminuyó en forma gradual, el mismo efecto se observa al día 5 para el ácido cítrico a 50 mmoles/kg lo que concuerda con los resultados obtenidos por Evangelou M. W. et al. (2006) quienes encontraron picos máximos de solubilidad de Zn por efectos de este mismo ácido. La disminución de la concentración en función del tiempo se puede deber a la re-precipitación o re-adsorción de los metales debido a la rápida biodegradación y mineralización de los AOBPM (**do Nascimento et al., 2006, Van Hees et al., 2003, Melo et al., 2008**).

En general la mayor cantidad de Pb y Zn en solución se presenta entre los días 3 y 5 de aplicación (Figura 3.3 y Figura 3.4). La cantidad de Pb solubilizado por los AOBPM a las dos concentraciones no superó 3 mg/kg, estos resultados concuerdan con el estudio realizado por do Nascimento C. W. A. et al. (2006), donde las cantidades de Pb solubilizadas por el ácido cítrico no rebasaron las 5 mg/kg. do Nascimento C. W. A. (2006) reportan además, bajos niveles de solubilidad tanto para Pb como para Zn por efecto de los ácidos vanílico y gálico, donde las concentraciones movilizadas para el caso del Pb son

inferiores a 3 mg/kg y para el caso del Zn, ninguno de los tres ácidos que evaluó superan las 10 mg/kg.

En el presente estudio (Figura 3.4) solamente el ácido cítrico a 100 mmoles/kg presentó un mayor efecto en la solubilidad del Pb en los días 1 y 3 (**Evangelou et al., 2006**), en comparación con el ácido málico a concentraciones equivalentes. Sin embargo, la capacidad de los dos ácidos a 50 mmoles/kg para solubilizar Pb son estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Lo que concuerda con los estudios realizados por Melo E. E. C. *et al.* (**2008**) y do Nascimento C. W. A. *et al.* (**2006**).

Los AOBPM aplicados al suelo tuvieron un efecto mayor ($p < 0.01$) en la solubilidad de lo Pb y Zn en comparación con el agua observándose un efecto decreciente a través del tiempo (Figura 3.3 y Figura 3.4).

Los resultados de esta prueba preliminar indican el potencial de ambos AOBPM en la solubilización de metales, aunque menor que lo reportado para el EDTA, resultó superior para el caso de los blancos. El Pb se ve más solubilizado por efecto del ácido cítrico a 100 mmoles/kg mientras que el ácido málico a 100 mmoles/kg tiene un mayor efecto en la solubilidad del Zn ($p < 0.01$) en el suelo contaminado de estudio.

3.3 Pruebas Piloto de Fitoextracción.

Una vez seleccionada la especie vegetal a utilizar (Sección 3.2.2), definidos los AOBPM y tiempos de aplicación de los tratamientos al suelo (Sección 3.2.1), se prosiguió a la germinación de la mostaza. Es importante mencionar que la

familia de las *Brassicaceae* se distingue por la capacidad de acumular una alta cantidad de metales, además su tiempo de crecimiento es considerablemente acelerado y una alta producción de biomasa (**Angelova et al., 2009**).

3.3.1 Germinación y Cultivo de Plantas de Mostaza.

Se obtuvo un alto porcentaje de viabilidad de las semillas de mostaza, sembradas en las charolas de propagación. El porcentaje de germinación de las semillas cultivadas en las instalaciones de los invernaderos de la Facultad de Agronomía de la UANL, fue de un 93%, obteniendo un total aproximado de 1116 plantas crecidas (Imagen 3.3).

Imagen 3.3 Plantas de mostaza tras 4 semanas posteriores a la siembra.



No se observaron síntomas de enfermedad en ninguna de las plantas sembradas y se observó una buena homogeneidad en el crecimiento de las plantas (10-16 cm de altura).

Esta cantidad de plantas producidas en las 4 semanas posteriores a la germinación, fue suficiente para el montaje tanto de la prueba de fitoextracción en campo como la prueba bajo condiciones controladas (625 y 40 plantas respectivamente).

3.3.2 Experimento Bajo Condiciones Controladas.

Las plantas seleccionadas para el trasplante fueron muy homogéneas (15 cm altura \pm 0.18) (N=40 \pm error estándar)

Posterior a las 6 semanas de la aplicación del tratamiento (una sola aplicación de ácido cítrico y málico a una concentración de 50 y 100 mmoles/kg), se cosechó la parte aérea de las plantas sembradas en cada maceta, se determinó la biomasa fresca y seca de cada uno de los tratamientos (Tabla 3.7).

Tabla 3.7 Pesos fresco y seco de las plantas obtenidas del experimento de fitoextracción bajo condiciones controladas en invernadero.

Pesos (g)	Tratamientos (mmoles/kg)				
	Cítrico 50	Cítrico 100	Málico 50	Málico 100	Control
PF	4.61 ^b \pm 0.62	4.13 ^{ab} \pm 0.73	6.66 ^{ab} \pm 0.69	5.59 ^{ab} \pm 0.45	7.89 ^a \pm 1.54
PS	0.79 ^b \pm 0.05	0.87 ^{ab} \pm 0.12	1.20 ^{ab} \pm 0.13	1.19 ^{ab} \pm 0.04	1.35 ^a \pm 0.17

PF: peso fresco, PS: peso seco (n=4 \pm error estándar). Letras diferentes después de los valores difieren estadísticamente según Tukey entre tratamientos ($p < 0.01$).

La cantidad de biomasa producida en el blanco (suelo contaminado sin AOBPM) también fue baja, además, en un menor número de plantas se observaron síntomas de toxicidad tales como necrosis. Estos resultados pueden sugerir la posibilidad de que la fitotoxicidad de los ácidos es menor comparada con la de los metales (**Evangelou et al., 2006, Melo et al., 2008, do Nascimento et al., 2006**), sin embargo es necesario estudiar el efecto en la producción de biomasa en un suelo libre de metales y de AOBPM.

Se observó una disminución de la biomasa en todos los tratamientos con los AOBPM en comparación con el control (Tabla 3.7), pero solo en el tratamiento con el ácido cítrico a 50 mmoles/kg se observó una diferencia estadística

($p < 0.05$), además de observarse síntomas de toxicidad como necrosis (**Melo et al., 2008**). Sin embargo, se tiene reportes que indican que los AOBPM se pueden aplicar al suelo con el objetivo de aumentar la biodisponibilidad de los metales sin afectar la biomasa (**Melo et al., 2008**). Este mismo efecto se observó en plantas de mostaza india (*Brassica juncea*) en el experimento realizado por do Nascimento C. W. A. et al. (**2006**), en el que aplicaron tratamientos con 4 AOBPM (oxálico, cítrico, gálico y vanílico).

La producción de biomasa en los tratamientos con ácido málico se vió reducida ($p < 0.01$) con síntomas de toxicidad menores en estas plantas (en comparación con los tratamientos con ácido cítrico) siendo a la mayor concentración la menor cantidad de biomasa producida (Tabla 3.7). Evangelou M. W. et al. (**2006**) obtuvieron resultados similares utilizando ácidos cítrico, oxálico y tartárico, siendo en los tratamientos con ácido cítrico en los que obtuvo menores cantidades de biomasa disminuyendo en función de la concentración.

Melo E. E. C. et al. (**2008**) encontraron también una disminución en la producción de biomasa en plantas de *Mucuna pruriens* (frijol aterciopelado) cultivadas en suelos contaminados con metales tratados con ácido cítrico (3 aplicaciones de 5 mmoles/kg cada una) en comparación con ácido gálico con el mismo tratamiento. Estos resultados son equiparables a los del presente estudio.

Tomando en cuenta que la toxicidad de los metales es mayor que la de los ácidos (**Evangelou et al., 2006, Melo et al., 2008, do Nascimento et al., 2006**) y donde se vieron un mayor número de plantas necróticas fue en los

tratamientos con ácido cítrico, se puede sugerir la presencia de una mayor acumulación de metales en las plantas con los tratamientos de ácido cítrico (Tabla 3.8).

Tabla 3.8 Concentración y contenido total de Pb y Zn en biomasa seca de Brassica juncea cultivadas en macetas tratadas con AOBPM. Factor de remediación (FR) (Vyslouzilova et al., 2003, Komarek et al., 2007) y Factor de bioconcentración (FBC) (Mench et al., 2010).

Tratamiento (mmoles/kg)	Metal	
	Pb	Zn
	<i>mg/kg</i>	
Cítrico 50	29.2 ^b ± 9.37	384 ^a ± 22.0
Cítrico 100	56.7 ^a ± 10.4	340 ^b ± 116
Málico 50	20.2 ^b ± 2.37	228 ^c ± 82.9
Málico 100	19.8 ^b ± 0.86	200 ^c ± 34.9
Blanco	9.27 ^c ± 0.35	106 ^d ± 27.7
	<i>µg</i>	
Cítrico 50	23.5 ^c ± 7.92	301 ^a ± 13.6
Cítrico 100	46.9 ^a ± 4.36	269 ^b ± 58.6
Málico 50	23.9 ^b ± 2.52	260 ^c ± 83.2
Málico 100	23.5 ^b ± 1.21	234 ^{bc} ± 35.8
Blanco	12.6 ^d ± 1.93	127 ^d ± 21.5
	<i>FR(%) / FBC</i>	
Cítrico 50	0.015 / 0.19	0.005 / 0.07
Cítrico 100	0.03 / 0.37	0.005 / 0.06
Málico 50	0.02 / 0.13	0.007 / 0.04
Málico 100	0.02 / 0.13	0.006 / 0.03
Blanco	0.01 / 0.06	0.004 / 0.02

Resultados promedio (n=4 ± error estándar). Letras diferentes después de los números difieren estadísticamente según Kruskal-Wallis (p<0.05) entre tratamientos.

En el presente experimento los AOBPM (cítrico y málico) (Tabla 3.8) aumentaron la concentración de los metales en las plantas, sin embargo el

ácido cítrico fue el que presentó los mejores resultados tanto para Pb como para Zn (**Melo et al., 2008**).

En las plantas tratadas con 100 mmoles/kg de ácido cítrico fue donde se presentó una mayor concentración de Pb (56.7 mg/kg). En cambio, en las plantas tratadas con 50 mmoles/kg de ácido cítrico, se observó mayor acumulación de Zn (384 mg/kg) (Tabla 3.8).

Efectos similares de solubilización inducida han sido encontrados por diversos autores al comparar el efecto producido por el ácido cítrico con otros AOBPM en los procesos de fitoextracción (**Evangelou et al., 2006, do Nascimento et al 2006**).

La cantidad de Zn acumulada por las plantas de mostaza, inducida por los AOBPM aplicados resultó superior comparado con el del Pb para todos los tratamientos (Tabla 3.8). Estas diferencias se pueden deber a la cantidad de metal presente en el suelo y a los grados de solubilidad que tienen estos metales en el suelo (**Melo et al., 2008**) y a la baja afinidad que tiene el ácido cítrico con el Pb ($K_s= 6.5$), lo cual sugiere el bajo potencial de este ácido para el proceso de fitoextracción del Pb (**Melo et al., 2008**).

Estudios realizados por Lesage E. *et al.* (**2005**) utilizando plantas de girasol para extraer Pb y Zn de un suelo contaminado mediante la aplicación de EDTA y ácido cítrico resultaron en acumulaciones máximas de 3 µg/planta de Pb con EDTA y 1.5 µg/planta con ácido cítrico, mientras que para el Zn las acumulaciones fueron de 110 µg/planta con EDTA y 60 µg/planta con ácido

cítrico (Tabla 3.8). Estos resultados comparados con los del presente trabajo sugieren un mayor potencial de la mostaza para el proceso de fitoextracción.

Los FBC (mg/kg planta/mg/kg suelo) mostrados en la Tabla 3.8 para todos los tratamientos resultaron menores a 1, que es el valor considerado como adecuado para la fitoextracción (**Mench et al., 2010, Zhao et al., 2003**), lo que indica dificultad de inducir la fitoacumulación de metales en condiciones reales en suelos contaminados con más de un metal (multimetal) (**Mench et al., 2010**). Se tienen reportes de que los metales en suelo presentan un efecto antagónico disminuyendo el efecto de acumulación en las plantas y que el atacar suelos contaminados con más de un metal por la fitoextracción es complicado (**do Nascimento et al., 2006**).

Los FR a las condiciones de trabajo del presente estudio resultaron bajos (Tabla 3.8), sin embargo, llevar a cabo una aproximación de la duración de la fitoremediación utilizando solamente los resultados obtenidos en esta prueba es complicado (**Wenger et al., 2002**), ya que es difícil extrapolar los datos obtenidos de una sola cosecha en macetas a las condiciones tanto de producción de biomasa en campo como el factor de remediación resultante (**Koopmans et al., 2007**).

Además, se ha sugerido que más de una sola aplicación de AOBPM puede aumentar en gran medida el grado de solubilidad de los metales aumentando la acumulación en las plantas sin afectar la cantidad de biomasa producida (**do Nascimento et al., 2006, Melo et al., 2008, Ulery et al., 2008**).

3.3.3 Experimento en Campo

Se construyeron las parcelas acordes a la Imagen 2.5, la Imagen 3.4 es el resultado de dicha esquematización llevada a campo. Las plantas de mostaza previamente cultivadas en la charolas de propagación se trasladaron en las parcelas experimentales. La misma metodología fue utilizada por Zhuang P. *et al.* (2007) quienes estudiaron 8 especies vegetales en suelo contaminado por Cd, Pb y Zn.

Imagen 3.4 Construcción de las parcelas y siembra de las plantas de mostaza en el sitio experimental.



La Imagen de la esquina inferior derecha corresponde a las plantas de mostaza removidas de la charola de propagación para ser trasplantadas en el sitio.

Las plantas gozaban de una aparente buena salud al momento de la aplicación del ácido cítrico y málico a las concentraciones de 50 y 100 mmoles/kg, esto basado en los resultados obtenidos de la sección 3.2.1. La Imagen 3.5 muestra las condiciones de las plantas al momento de la aplicación de los tratamientos.

Imagen 3.5 Parcelas experimentales al momento de aplicación del ácido cítrico y málico a una concentración de 50 y 100 mmoles/kg..



Al momento de la cosecha de las plantas (10 semanas después del trasplante) de mostaza (Imagen 3.6) se observaron algunos signos de toxicidad en las plantas de los tratamientos con ácido cítrico a 100 mmoles/kg (marchitamiento de plantas, hojas secas, bajo crecimiento) lo que se puede deber a la toma de metales (**Melo et al., 2008**). Además se ha reportado que los AOBPM no tienen un efecto muy marcado en la toxicidad de las plantas (**Robinson et al., 2003, Zhuang et al., 2005, Zhuang et al., 2007, Keller et al., 2002, Korenkov et al., 2007**). Se registró la altura de cada una de las plantas muestreadas y se encontró una baja variabilidad en la altura final de las plantas (45 cm promedio $n=224 \pm 0.70$ error estándar).

Imagen 3.6 Momento de la cosecha de las plantas de mostaza (7 semanas después del trasplante).



La Tabla 3.9 muestra el peso fresco y seco de las plantas al momento de la cosecha. Zhuang P. *et al.* (2007) reportan tiempos de 7 días para la cosecha después de la aplicación de los tratamientos, sin embargo y de acuerdo a los resultados obtenidos de degradación de los AOBPM, se optó por dejar correr la fitoextracción durante 10 días para lograr una mejor remoción.

Tabla 3.9 Peso fresco y seco de *Brassica juncea* por parcela útil (excluyendo parcelas inútiles) cultivadas en un suelo contaminado por Pb y Zn.

Pesos (g/parcela)	Tratamientos (mmoles/kg)				
	Cítrico 50	Cítrico 100	Málico 50	Málico 100	Control
PF	406 ^a ± 61.0	478 ^a ± 137	543 ^a ± 115	556 ^a ± 129	536 ^a ± 115
PS	46.1 ^a ± 3.55	49.0 ^a ± 12.4	52.7 ^a ± 10.7	56.8 ^a ± 8.20	53.5 ^a ± 10.0

PF: peso fresco, PS: peso seco, resultados promedio (n=5 ± error estándar). Letras diferentes después de los valores no difieren estadísticamente según Tukey (p>0.05) entre tratamientos.

El análisis estadístico no reveló diferencia significativa (p>0.05) de la biomasa entre los tratamiento (Tabla 3.9). Sin embargo, se observó un efecto en la disminución de la biomasa en los tratamientos con el ácido cítrico (Melo *et al.*,

2008, do Nascimento et al., 2006), estos resultados son consistentes con los encontrados en el experimento bajo condiciones controladas del presente estudio.

La Tabla 3.10 presenta la concentración de Pb y Zn en *Brassica juncea* obtenida así como, los factores de remediación de cada tratamiento y sus factores de bioconcentración.

Tabla 3.10 Concentración y contenido total de Pb y Zn en biomasa seca de Brassica juncea cultivadas en campo tratado con AOBPM. Factor de remediación (FR) (Vyslouzilova et al., 2003, Komarek et al., 2007) y Factor de bioconcentración (FBC) (Mench et al., 2010).

Tratamiento (mmoles/kg)	Metal	
	Pb	Zn
		<i>mg/kg</i>
Cítrico 50	20.2 ^a ± 2.67	445 ^a ± 51.2
Cítrico 100	21.1 ^a ± 3.74	432 ^a ± 42.6
Málico 50	19.1 ^a ± 3.42	442 ^a ± 78.5
Málico 100	18.7 ^a ± 2.91	415 ^a ± 98.9
Blanco	17.4 ^a ± 2.89	96.9 ^b ± 14.5
		<i>µg</i>
Cítrico 50	103 ^a ± 13.4	2287 ^a ± 253
Cítrico 100	110 ^a ± 18.4	2267 ^a ± 195
Málico 50	96.5 ^a ± 16.7	2231 ^a ± 387
Málico 100	95.9 ^a ± 15.2	2118 ^b ± 498
Blanco	89.7 ^a ± 15.2	499 ^c ± 77
		<i>FR(%) / FBC</i>
Cítrico 50	0.022 / 0.13	0.014 / 0.086
Cítrico 100	0.024 / 0.13	0.015 / 0.084
Málico 50	0.023 / 0.12	0.016 / 0.086
Málico 100	0.025 / 0.12	0.016 / 0.081
Blanco	0.022 / 0.11	0.003 / 0.018

Resultados promedio (n=10 ± error estándar). Letras diferentes después de los números difieren estadísticamente según Tukey (p<0.01) entre tratamientos.

El efecto de los 2 AOBPM en la acumulación de Zn por la mostaza fue significativo (p<0.01) para ambas dosis de aplicación.

Se encontró una diferencia significativa (p<0.01) en las cantidades acumuladas de Zn por las plantas en los tratamientos con respecto al control. Se observó un

efecto positivo en la capacidad de los AOBPM aumentando la biodisponibilidad de Zn en la acumulación por las plantas de mostaza (Tabla 3.10).

La concentración de Zn acumulada por las plantas de mostaza por efecto de los AOBPM (Tabla 3.10) resultaron superiores a las concentraciones acumuladas reportadas para plantas de *Vertiveria zizanioides*, *Dianthus chinensis* y *Rumex acetosa* por efecto del EDTA (6mmoles/kg) (Zhuang *et al.*, 2007) en un suelo contaminado con 1,050 mg/kg de Zn total.

La acumulación de Zn reportada por Solhi M. *et al.* (2005), inducida por la aplicación 3 mmoles/kg de DTPA, en *Heliantus annuus* y *Brassica napus* (1,364 mg/kg y 817 mg/kg respectivamente) en un suelo contaminado con 2,738 mg/kg de Zn total es superior a las acumulaciones en el presente estudio por efecto de los AOBPM aplicados. Esto sugiere una mayor capacidad de solubilidad del metal por efecto del DTPA en comparación con los AOBPM en el presente estudio.

La acumulación de Zn en las plantas de mostaza (444 y 20.2 mg/kg respectivamente) observadas en el presente estudio (Tabla 3.10) resultaron mayores que las concentraciones encontradas por Zhuang P. *et al.* (2007) en *Rumex sp.* 114 mg/kg, *Vertiveria zizanioides* 144 mg/kg, *Dianthus chinensis* 282 mg/kg y *Rumex acetosa DSL* 151 mg/kg.

Se observó un notable incremento ($p < 0.01$) en las acumulaciones de Zn en las plantas por la aplicación de los tratamientos en comparación con el blanco (Tabla 3.10). Sin embargo, este mismo efecto no se presentó en Pb ya que no hubo diferencia estadística ($p > 0.05$) comparada con el control. Zhuang P. *et al.*

(2007) observaron un comportamiento similar para estos mismos dos metales en sus aplicaciones de EDTA al suelo en *Vertiveria zizanioides*, *Sedum alfredii* y *Dianthus chinensis*. Se tienen reportes sobre el bajo nivel de acomplejamiento de los AOBPM con el Pb además de una baja solubilidad y fuerte interacción del metal con los componentes del suelo (**Schroeder et al., 2009, Ulery et al., 2008, Evangelou et al., 2006**). Esto podría explicar los bajos niveles de acumulación de este metal. Además, se puede deber al grado de solubilidad y movilidad de los dos metales por efecto de los AOBPM (**do Nascimento et al., 2006**) siendo mayor para el Zn que para el Pb. Esto se puede corroborar por la menor concentración de Pb en la biomasa comparado con la de Zn en las plantas control (Tabla 3.10).

El bajo potencial del ácido cítrico y málico (así como del resto de los AOBPM estudiados en el presente trabajo) para movilizar el Pb y actuar aumentando la acumulación de este metal en las plantas (**Melo et al., 2008**) se puede explicar por la baja afinidad de los ácidos con el Pb, y para el caso particular del ácido cítrico y málico, se refleja en la baja translocación del metal (**Melo et al., 2008**).

Se ha demostrado en diferentes estudios el potencial que tiene el EDTA y algunos otros agentes sintéticos (e.g. DTPA) en la solubilidad y biodisponibilidad de Pb (**Ulery et al., 2008, Melo et al., 2008**). Los resultados obtenidos con las bajas remociones de Pb en el presente estudio son consistentes con trabajos realizados por otros autores usando AOBPM (**Lesage et al., 2005, Cui et al., 2004, Evangelou et al., 2006**).

Los FR obtenidos para el Pb no presentaron diferencia ($p > 0.05$) entre los tratamientos, ni siquiera en comparación con el blanco. Estos resultados son consistentes con lo obtenidos por Zhuang P. *et al.* (2005), donde estudiaron el comportamiento de *Vertiveria zizanioides* en un suelo contaminado con Cd (7 mg/kg), Pb (2078 mg/kg) y Zn (2472 mg/kg) en campo obteniendo FR menores a 0.05% para el Pb en los tratamientos, donde además, no encontró diferencias significativas entre los tratamientos en relación con el blanco.

Estudios realizados por Zhuang P. *et al.* (2007) demuestran que la aplicación de EDTA aumentó sustancialmente el FR en algunas plantas (*Vertiveria baoshanensis*, *Rumex crispus* y *Rumex sp.*) tanto para Pb como para Zn (Komarek *et al.*, 2007). Sin embargo, e incluso con la aplicación de EDTA, las 8 especies vegetales que estudió alcanzaron solamente un máximo de 0.12% de FR de Pb, mientras que el presente estudio obtuvo máximos de 0.024%, sugiriendo una menor capacidad de los AOBPM que el EDTA en aplicaciones en campo para inducir la acumulación de Pb.

El porcentaje de remoción del presente estudio es similar para el caso del Pb en algunas de las especies estudiadas por Zhuang P. *et al.* (2007) (0.03% *Vertiveria zizanioides* y 0.04% para *Sedum alfredii* y *Dianthus chinensis*). Con esto la mostaza puede ser una buena opción antes que estas 3 especies analizadas.

El mayor FBC calculado de Pb para la mostaza fue de 0.13 para el presente estudio (Tabla 3.10). En cambio, el FBC para el Zn resultó bajo (Tabla 3.10) debido muy probablemente a la concentración total del metal (5113 mg/kg)

presente en el suelo de estudio (Tabla 3.4), que al ser elevada, disminuye en gran medida los FBC de las plantas estudiadas.

Los FR de Zn obtenidos en este trabajo (Tabla 3.10) resultaron bajos, lo que sugiere que la eficiencia de la fitoremediación está en función de la cantidad de contaminantes presentes en un sitio y la cantidad de biomasa producida (**Zhuang et al., 2005, Zhao et al., 2003, Farwell et al., 2006, Schwartz et al., 2003, Mench et al., 2010**). Aplicando técnicas agronómicas de cultivo para obtener la mayor producción de mostaza posible por unidad de área el valor obtenido de FR de Zn y Pb se verían aumentados.

Los FR obtenidos para el caso del Zn en el experimento de campo resultaron diez veces superiores a los obtenidos en las plantas cultivadas bajo condiciones controladas, esto se debe a la cantidad de biomasa producida en cada tipo de cultivo. Resultados similares, pero en menor medida se encontraron para el Pb (Tabla 3.10).

La clave para definir el potencial de la fitoextracción para cualquier especie vegetal es la alta producción de biomasa, el FBC y el volumen de suelo a remediar (**Zhao et al., 2003**). En el presente estudio no se explotó en su totalidad la capacidad de la planta para producir biomasa ya que era necesario aislar, bajo condiciones controladas, las variables a probar durante el proceso de fitoextracción tales como el tipo de ácido a utilizar y su concentración. Los resultados del presente estudio demostraron un efecto ampliamente reportado en la literatura, que es la dificultad intrínseca del Pb para movilizarse y formar especies biodisponibles en la zona de la raíz (**Zhuang et al., 2007**). Además se

pudo haber presentado un efecto de competencia entre metales ocasionando un efecto antagónico en el proceso de la acumulación de Pb y Zn por parte de las plantas de mostaza (**do Nascimento et al., 2006**).

La cantidad de biomasa producida por planta fue mayor en el experimento en campo (Tabla 3.9) comparado con el experimento bajo condiciones controladas (Tabla 3.7) en el mismo periodo de tiempo, lo cual indica que el proceso de fitoextracción tardaría menos tiempo en campo ya que la producción de una alta cantidad de biomasa es un punto clave para el éxito de la fitoextracción (**Koopmans et al., 2007**). Es posible que la diferencia en cuanto a la producción de biomasa (Tabla 3.7 y 3.9) se deba al espacio disponible para el crecimiento de las plantas, en el experimento en macetas el espacio es menor lo que impide el correcto desarrollo de las raíces de la planta y por lo tanto el crecimiento de la planta será más limitado.

La cantidad de metal total (μg) extraído por las plantas de mostaza del experimento bajo condiciones controladas (macetas) (Tabla 3.8) fue mucho menor comparado con la cantidad de metal extraído en campo (Tabla 3.10) principalmente debido a la cantidad de biomasa producida por las plantas, ya que al tener una mayor producción de biomasa la cantidad de metal total extraído es mayor. Se ha reportado que niveles altos de contaminación de metales pesados en suelo pueden tener una influencia negativa en el crecimiento y toma de metales en procesos de fitoextracción con plantas de *Brassica* cultivadas bajo condiciones controladas en macetas mas no en procesos de fitoextracción en campo, ya que los metales pueden alterar el

proceso de fotosíntesis de la planta conduciendo a una baja producción de biomasa e incluso la muerte de la planta (**Angelova et al., 2009**). Esta puede ser la razón principal de las diferencias de acumulación y producción de biomasa en los experimentos llevados a cabo en el presente estudio. Esta aseveración se confirma con los resultados obtenidos por Angelova V. et al. (**2009**) quien encontró una acumulación de 20 veces más de Pb y 2 veces más de Zn en plantas de *Brassica nigra* cultivadas en campo comparadas con plantas cultivadas bajo condiciones controladas.

La acumulación de Zn total (μg) es, en el presente estudio, entre 7 a 9 veces mayor en el experimento en campo (Tabla 3.10) comparado con el experimento bajo condiciones controladas en los tratamientos con los AOBPM, mientras que para el Pb el orden de acumulación (μg) es superior de 2 a 4 veces para los tratamientos.

La concentración de Zn en el caso del experimento en campo (Tabla 3.10) resultó mayor que la concentración en el experimento bajo condiciones controladas (Tabla 3.8) de acuerdo al análisis estadístico ($p < 0.05$), resultados similares fueron encontrados por Angelova V. et al. (**2009**) quienes realizaron un estudio comparativo de fitoextracción entre cultivos en campo y maceta utilizando *Brassica nigra* y el mismo suelo, encontrando una mayor acumulación tanto de Pb como de Zn en las plantas cultivadas en campo en un suelo contaminado con 1900 mg/kg de Zn total y 913 mg/kg de Pb total. La acumulación de Pb reportada por Angelova V. et al. (**2009**) fue de 67 mg/kg en las plantas cultivadas en campo y de 3.1 mg/kg en las plantas cultivadas en

maceta, así mismo, la acumulación de Zn fue de 317 mg/kg en plantas cultivadas en campo y de 180 mg/kg en plantas cultivadas en maceta.

La diferencia en la cantidad de metal acumulado (Pb y Zn) (mg/kg) entre los dos experimentos (Tabla 3.8 y 3.10) se puede deber por un lado a la cantidad de biomasa producida ya que, al ser mayor la biomasa, la planta requiere una mayor cantidad de agua (vehículo de entrada de los metales a la planta) (**Koopmans et al., 2007**) y que existe una correlación directa entre la cantidad de metal en solución con la cantidad de metal acumulado por las plantas (**Wenger et al., 2002**). Otra posible explicación es la cantidad de raíz generada por las plantas, a mayor raíz se presenta una mayor acumulación (**Farwell et al., 2006**), al tener una extensión mayor de terreno, la raíz puede extenderse sin problemas mientras que la raíz de una planta cultivada en macetas está limitada solo a la cantidad de suelo por maceta. Al cubrir la raíz una extensión mayor, es probable que pueda tomar una mayor cantidad de nutrientes y agua necesarios para su crecimiento y al mismo tiempo tomar los metales presentes en el suelo (**Farwell et al., 2006**).

La acumulación (mg/kg) de Zn en las plantas del presente estudio son superiores a las encontradas por Angelova V. et al. (**2009**) en *Brassica nigra* (316 mg/kg en plantas de campo y 180 mg/kg en plantas de maceta) tanto en los cultivos bajo condiciones controladas (Tabla 3.8) como las plantas cultivadas en campo (Tabla 3.10).

Los FR obtenidos para el caso del Zn en el experimento de campo (Tabla 3.10) resultaron diez veces superiores a los obtenidos en las plantas cultivadas bajo

condiciones controladas (Tabla 3.8), esto se debe a la cantidad de biomasa producida en cada tipo de cultivo. Resultados similares, pero en menor medida se encontraron para el Pb.

Ahora bien, es importante realizar experimentos en campo y no solamente bajo condiciones controladas de laboratorio ya que los resultados obtenidos en cada aproximación pueden variar considerablemente, como el caso de la producción de biomasa y acumulación de metales encontrados en el presente estudio y por el desarrollado por Angelova V. *et al.* (2009), donde se compararon los resultados obtenidos en experimentos tanto de laboratorio como de campo.

Proyecciones de remediación.

Las proyecciones de remediación se realizaron usando los datos obtenidos a partir de las pruebas realizadas en campo, ya que reflejan el comportamiento de las plantas de una manera más realista.

Una vez analizados los resultados obtenidos en la prueba de campo, se modeló el tiempo necesario para la remediación de Pb y Zn en el sitio contaminado de estudio utilizando las bases experimentales del sistema propuesto en este estudio.

Para llevar a cabo la proyección de la remediación se tomó en cuenta la cantidad total del metal acumulado en la planta (Pb y Zn) (Tabla 3.10), la cantidad de metal total presente en el suelo de estudio (Tabla 3.4), se asumió una productividad de biomasa seca de mostaza por año (24 ton) de acuerdo a Bartholomew H. M. *et al.*, (1990), y la cantidad (g) de suelo presentes en los 30

cm superficiales por hectárea a remediar (3,213 ton). Además, se asumió la siembra y cultivo de las plantas de mostaza entre los meses de Octubre a Marzo.

Con los valores anteriores el FR (por cosecha) resultó de 0.33% para el Zn y de 0.51% para el Pb. De acuerdo a estos porcentajes una cosecha de mostaza en el área de estudio, tomando en cuenta las suposiciones anteriores, podría remover 17.1 mg/kg de Zn y 0.78 mg/kg de Pb del suelo. Más aún, si asumimos que es posible realizar 6 cosechas anuales de mostaza, la cantidad anual (en el ciclo de invierno) de remoción de Zn sería de 102.5 mg/kg y 4.65 mg/kg de Pb del suelo.

Una vez establecida la cantidad de remoción de cada uno de los metales en función del número de cosechas y del tiempo de cultivo, se construyeron una serie de figuras (Figura 3.5 a 3.8) donde se representa el tiempo necesario para la remediación del sitio para cada uno de los metales estudiados con la aplicación del AOBPM a la concentración con mejores resultados obtenidos en la sección 3.3.3 (i.e. ácido cítrico a 50 mmoles/kg) en comparación con el tratamiento control (sin aplicar ningún AOBPM).

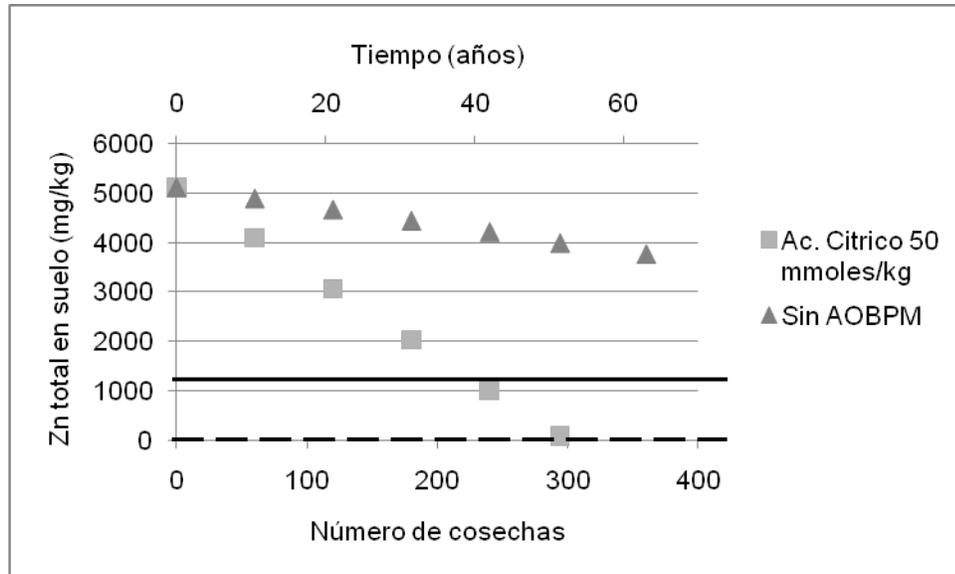


Figura 3.5 Proyección del tiempo de remediación de Zn en un suelo contaminado usando fitoextracción asistida por ácido cítrico a 50 mmoles/kg utilizando *Brassica juncea*, durante el ciclo invernal asumiendo 6 cosechas por año. La línea continua represente el LMP según la regulación mexicana (**NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004**) y la línea punteada representa el LMP de la Unión Europea.

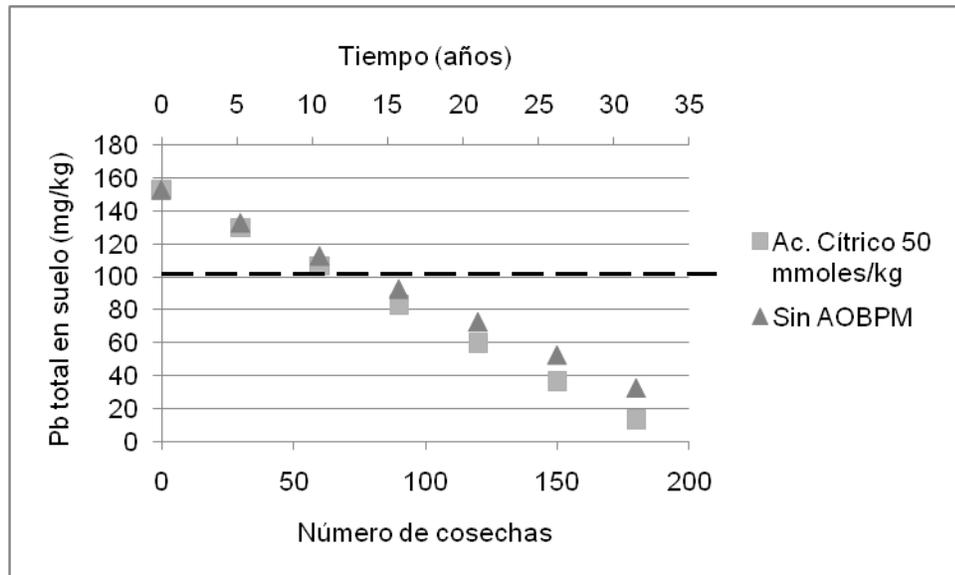


Figura 3.6 Proyección del tiempo de remediación de Pb en un suelo contaminado usando fitoextracción asistida por ácido cítrico a 50 mmoles/kg utilizando *Brassica juncea*, durante el ciclo invernal asumiendo 6 cosechas por año. La línea punteada corresponde al LMP de Pb según algunos países de la UE.

Las Figuras 3.5 y 3.6 comparan el tiempo aproximado de remediación de cada uno de los contaminantes en el sitio tomando en cuenta la aplicación del agente acomplejante o la falta del agente para inducir la acumulación en *Brassica juncea*. Como se puede observar en la Figura 3.5 para el caso del Zn se observa una clara diferencia en el tiempo de extracción del metal, cuando se aplica el ácido cítrico al suelo el tiempo de remediación es de 35 años teniendo un remanente de 1500 mg/kg, comparado con la remediación en donde no se aplicó el AOBPM, que en el mismo tiempo la cantidad remanente de contaminante en el suelo sería cercana a 4300 mg/kg.

En la Figura 3.6 se observa que el tiempo para disminuir la concentración de Pb hasta niveles no tóxicos, de acuerdo a la regulación de algunos países de la UE, es de aproximadamente 11 años aplicando ácido cítrico a una concentración de 50 mmoles/kg utilizando *Brassica juncea*. Esto podría considerarse un tiempo razonable debido a que la fitoextracción es un proceso que requiere tiempo, se reportan tiempos de más de 60 años e incluso más de 100 años en algunos casos para llevar a cabo la remediación de sitios contaminados por metales (**Schroeder et al., 2009, Wenger et al., 2002**). Además, el costo de la fitoextracción resulta más atractivo que muchas de las técnicas convencionales reportadas (**EPA 2000, Fassler et al., 2010**).

Ahora bien, en el caso de la proyección de remediación del Pb, en el suelo estudiado, no se observó una disminución en el tiempo (12 años) si se aplicara o no el AOBPM. Una posible explicación es el bajo nivel de translocación reportado utilizando ácido cítrico para la acumulación de Pb en plantas de mostaza. Nascimento C. W. A. et al. (2006) encontraron un valor de translocación de 0.22 utilizando *Brassica juncea* como planta acumuladora en un suelo contaminado con 121 mg/kg de Pb utilizando 2 mmoles/kg de ácido cítrico como agente acomplejante. Evangelou M. W. et al. (2006) encontraron que los niveles de acumulación en plantas de tabaco eran similares tanto en los controles como en las plantas con tratamientos de 65 mmoles/kg de ácido cítrico en un suelo contaminado con 300 mg/kg de Pb, esto nos indica que no solo en las plantas de mostaza se tienen niveles de acumulación similares a los de las plantas control.

De acuerdo a la proyección llevada a cabo en el presente estudio y según los resultados obtenidos, la remediación de Zn en el sitio estudiado para el Zn (Figura 3.5) se lograría aproximadamente en 35 y 45 años para llegar a concentraciones por debajo del LMP de la regulación mexicana y de la regulación de la UE respectivamente aplicando ácido cítrico a 50 mmoles/kg y utilizando *Brassica juncea* durante el ciclo de invierno.

El tiempo de remediación de Zn en el suelo estudiado resultó menor comparado con el reportado por Zhuang P. *et al.* (2005), quienes reportaron tiempos aproximados de 65 años para remediar un suelo contaminado con 924 mg/kg de Zn total aplicando EDTA utilizando *V. baoshanensis*.

Se ha demostrado además que mediante la rotación de cultivos es posible disminuir los tiempos de fitoextracción (Keller *et al.*, 2002) ya que se produce biomasa durante todo el año no solamente durante la temporada de cultivo de una sola especie vegetal. Si además de mostaza, que es una planta invernal, se asumiera el cultivo de plantas de verano de alta producción de biomasa que haya demostrado una buena eficacia en la fitoextracción de metales (e.g. el maíz *Zea mays*) (Wenger *et al.*, 2002, López-Chuken y Young 2005) el tiempo de fitoextracción del Zn y Pb en el presente estudio podría disminuir en forma considerable.

Las Figura 3.7 y 3.8 ejemplifican el tiempo que tomaría la remediación de Zn y Pb respectivamente del sitio contaminado del presente estudio asumiendo una alternativa entre dos especies vegetales de acuerdo a su época de siembra (i. e. rotación de cultivos). Para esta proyección de la remediación, se asumen

para el caso de la mostaza los valores experimentales obtenidos del presente estudio y en el caso del maíz se asumieron valores experimentales reportados en los estudios de Wenger K. *et al.* (2002) y Wu Q. T. *et al.* (2007) y que corresponden a una acumulación promedio de 1270 mg/kg de Zn total y 60 mg/kg de Pb total y a una producción de biomasa seca sin producción de mazorca de 35 ton por hectárea (Peña *et al.*, 2002).

Para realizar la estimación en cuanto a la proyección de remediación aplicado al presente estudio se tomó un valor medio de acumulación de Zn por maíz de 1269 mg/kg resultado del promedio de los datos obtenidos por Wenger K. *et al.* (2002) y Wu Q. T. *et al.* (2007) y se calculó el FR hipotético para el maíz (0.27%) bajo las condiciones de estudio del presente trabajo. La acumulación de Pb en el maíz se asumió de 60 mg/kg según lo reportado por Cui Y. *et al.* (2004) y bajo las mismas condiciones se calculó el FR hipotético para fines de proyección de remediación (0.43%). Se asumió además la posibilidad de sembrar maíz hasta 4 veces por año de acuerdo a lo reportado por Nascimento C. W. A. *et al.* (2009).

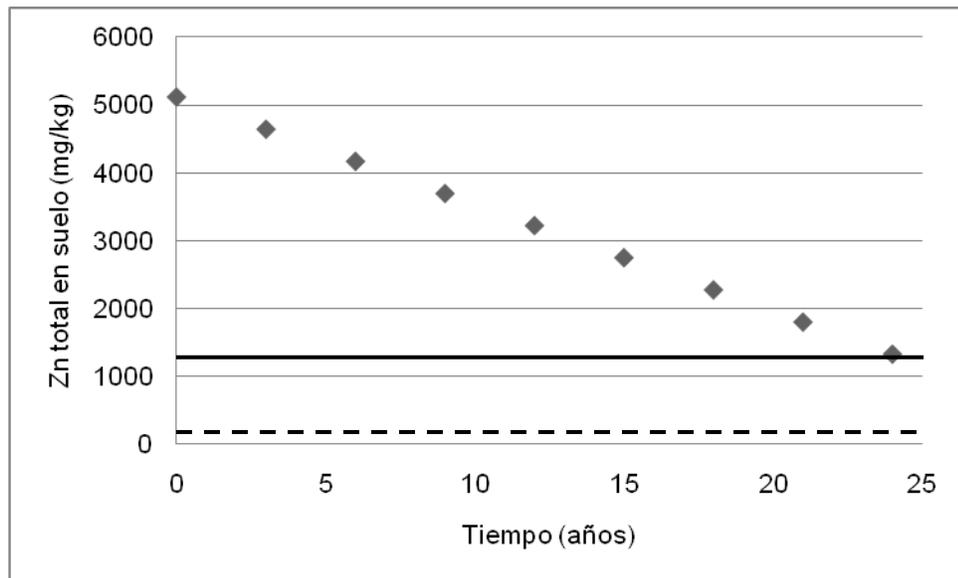


Figura 3.7 Proyección hipotética del tiempo de remediación para Zn en un suelo contaminado usando fitoextracción asistida por ácido cítrico a 50 mmoles/kg utilizando *Zea mays* y *Brassica juncea* rotando cultivos por temporada asumiendo 4 cosechas anuales de maíz y 6 de mostaza.

El número de cosechas para el maíz se asumió en 4 por año y el número de cosechas para la mostaza es de 6 por año. La producción de biomasa seca se asumió en 35 ton por hectárea para el maíz y en 24 ton por hectárea para la mostaza. La acumulación asumida para el maíz es de 1269 μg y para la mostaza es de 2287 μg . Los FR obtenidos son de 0.27 para el maíz y de 0.33 para la mostaza. La línea continua representa el LMP según la regulación mexicana (**NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004**) y la línea punteada representa el LMP de la Unión Europea.

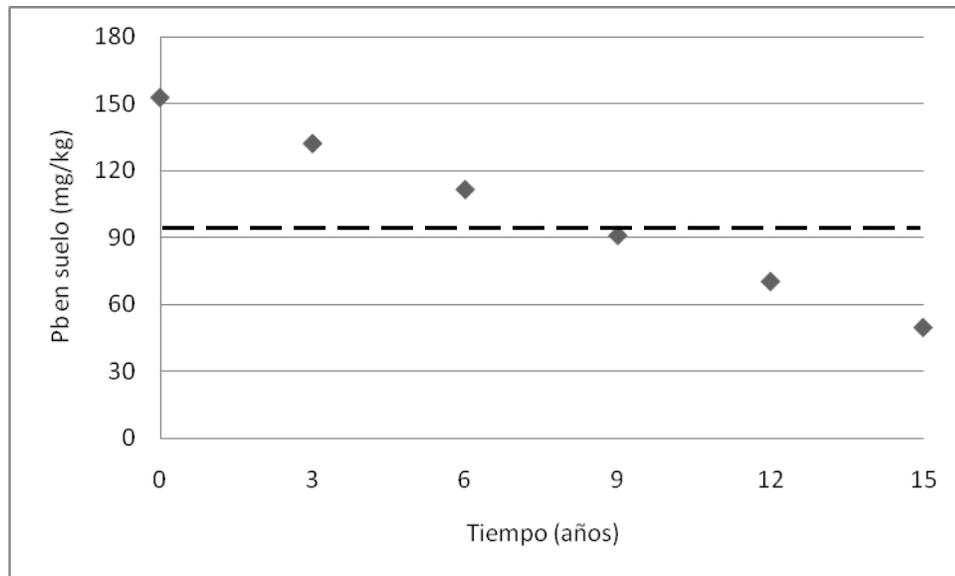


Figura 3.8 Proyección hipotética del tiempo de remediación para Zn en un suelo contaminado usando fitoextracción asistida por ácido cítrico a 50 mmoles/kg utilizando *Zea mays* y *Brassica juncea* rotando cultivos por temporada asumiendo 4 cosechas anuales de maíz y 6 de mostaza.

El número de cosechas para el maíz es de 4 por año y el número de cosechas para la mostaza es de 6 por año. El número de cosechas para el maíz se asumió en 4 por año y el número de cosechas para la mostaza es de 6 por año. La producción de biomasa seca se asumió en 35 ton por hectárea para el maíz y en 24 ton por hectárea para la mostaza. La acumulación asumida para el maíz es de 60 μg y para la mostaza es de 104 μg . Los FR obtenidos son de 0.43 para el maíz y de 0.51 para la mostaza. La línea punteada represente el LMP según algunos países de la UE.

Según los resultados de la Figura 3.7, el tiempo estimado de 35 años para la remediación de Zn en el sitio experimental utilizando solo *Brassica juncea* (ver Figura 3.5) disminuye hasta 23 años aproximadamente al aplicar la rotación de cultivos utilizando *Zea mays* como planta de verano para la fitoextracción

(Figura 3.7), es decir, el tiempo propuesto de remediación utilizando dos especies vegetales disminuye teóricamente en un 35 %.

De igual manera, bajo las mismas suposiciones de la Figura 3.8 el tiempo de remediación para el Pb sería de poco menos de 8 años (Figura 3.8) aplicando esta misma estrategia para la remoción de los metales del suelo, menor que el tiempo necesario si solo se trabajara con *Brassica juncea* (Tabla 3.6).

Sin embargo, realizar una proyección más realista del tiempo de la remediación en el suelo estudiado requerirá de trabajos futuros ya que se debe de establecer la cantidad de metal que pueden extraer diferentes variedades de maíz bajo los tratamientos y condiciones experimentales descritas en el presente estudio.

Estos tiempos puede variar ya que es difícil llevar a cabo una extrapolación de la remediación a estos niveles (**Koopmans *et al.*, 2007, Wenger *et al.*, 2002**). Además, se conoce que la concentración de los metales disponibles disminuye conforme se aumenta el número de cosechas en el sitio (**Robinson *et al.*, 2007, Wenger *et al.*, 2002**).

Sin embargo, existen métodos para poder acelerar aún más este proceso de remediación, entre los cuales se encuentran la aplicando técnicas agronómicas sustentables tales como riego por goteo para mantener todo el tiempo la humedad óptima del suelo (y por ende la solubilidad de los metales); el uso de fertilizantes o compostas para aumentar biomasa y reducir tiempo de crecimiento; el control biológico de plagas para minimizar la pérdida de biomasa, entre otras.

Otra estrategia novedosa y poco explotada para aumentar la acumulación de las plantas y disminuir el tiempo de remediación bajo estas condiciones es la aplicación de hormonas de crecimiento a las plantas con el fin de obtener una mayor producción de biomasa (**Mench et al., 2010**). Otra es la aplicación de agentes quelantes antes de la siembra en campo (**Wenzel et al., 2003, Solhi et al., 2005**) o realizar aplicaciones secuenciales de los agentes (**Ulery et al., 2008, Melo et al., 2008**).

Un punto importante a considerar es que, durante el tiempo de la fitoextracción de metales, existe la posibilidad de aprovechar la productividad de las plantas para generar otros beneficios (**Wenger et al., 2002**) (además de la remediación por si misma (**Schroeder et al., 2009**)). Por ejemplo, al enfoque que se le ha dado de utilizar las plantas para una ganancia económica tras el proceso de fitoextracción se le conoce como fitoadministración (**Fassler et al., 2010, Mench et al., 2010**). Tal aproximación se ha podido desarrollar debido a que las plantas tienden a acumular diferente cantidad de metal en las diferentes partes de estas, por ejemplo, el maíz, por lo general, acumula más metales en tallo y hojas que en la semilla (**Fassler et al., 2010**).

Algunas aplicaciones de la fitoadministración son: obtención de bio-aceite a partir de la de la semilla de girasol o tabaco (**Mench et al., 2010, Wenger et al., 2002**), la semilla de maíz se puede utilizar como alimento para ganado, siempre y cuando cumpla con las regulaciones que permitan su uso, mientras que el tallo y las hojas se puede utilizar para procesos bioenergéticos (**Fassler et al., 2010**).

Se ha hablado a lo largo del presente estudio acerca de la ventaja en cuanto al costo-beneficio de la aplicación de la fitoextracción comparado con otras técnicas de remediación de suelos contaminados por metales pesados. Para ejemplificar esto, se realizó un análisis preliminar de los costos que implicaría el uso de esta técnica en un sitio con condiciones similares a las estudiadas. Se realizó una extrapolación de la aplicación de ácido cítrico a 50 mmoles/kg en una hectárea suponiendo una contaminación por metales pesados. El costo aproximado de las 3 toneladas de ácido cítrico requerido para la aplicación en el suelo es de \$ 1125 USD (de acuerdo a **The TNN Development Limited**). De igual manera se determinó el costo aproximado de labranza y siembra para la mostaza en una hectárea siendo aproximadamente \$ 200 USD (**Curioni et al., 2010**). Se asumió el costo de las semillas (5 kg) requeridas para sembrar 1 hectárea y su costo aproximado (\$ 40 USD (**Bekarem S.A de C.V.**)). Finalmente se determinó el costo aproximado de la cosecha del forraje de mostaza en la misma extensión de terreno siendo aproximadamente \$ 150 USD. De esta manera el costo por siembra y cosecha de la mostaza sería de aproximadamente \$ 1515 USD, esto por cada una de las siembras realizadas en el sitio, si se asumiera la siembra de 6 cultivos, como ya se ha planteado, el costo aproximado anual sería de \$ 9000 USD, menos de los \$ 40000 USD propuestos, como costo anual de fitoextracción, por la EPA (**2000**).

Una vez obtenidos los costos finales de producción de mostaza se podría incluso determinar la posibilidad de utilizar la semilla de mostaza con fines comerciales (esto en caso de cumplir con los requerimientos establecidos por

las agencias regulatorias alimenticias en cuanto al contenido de metales) para obtener un beneficio económico, ya que según Curioni A. *et al.* (2010) la producción de semilla de mostaza es un proceso rentable obteniendo ganancias cercanas al 400% de la inversión realizada.

De esta manera es posible sugerir la autosustentabilidad ambiental y económica del proceso sin necesidad de la inversión constante de recursos económicos tal como se maneja en la fitoadministración (Fassler *et al.*, 2010, Mench *et al.*, 2010).

CAPITULO 4
CONCLUSIONES

4 CONCLUSIONES.

- Se identificó y caracterizó un suelo históricamente contaminado encontrando que el Pb y Zn superan los LMP de la regulación de México, EUA y la UE.
- De los 9 AOBPM utilizados, los ácidos aspártico, cítrico y málico (100 mmoles/kg) dieron mejores resultados para la solubilización de Pb y Zn en el suelo de estudio bajo condiciones de laboratorio.
- Pruebas indirectas de degradación del ácido cítrico y málico en función del tiempo sugirieron un tiempo de al menos 9 días para tener la mayor solubilización de Pb y Zn en el suelo estudiado.
- De las plantas estudiadas, la mostaza india (*Brassica juncea*) presentó las mejores características de adaptación y acumulación de Pb y Zn en el suelo de estudio.
- Las pruebas piloto de fitoextracción, en campo y bajo condiciones controladas indicaron que, aplicando tratamientos de 50 y 100 mmoles/kg de ácido cítrico y málico, la mostaza tiene la capacidad de acumular Zn, sin embargo, este mismo comportamiento no se observó en la acumulación de Pb debido probablemente a la baja capacidad de translocación de este metal por la planta.
- El análisis estadístico demostró que el tratamiento al suelo con 50 mmoles/kg de ácido cítrico en campo fue el mejor agente para el proceso de fitoextracción utilizando *Brassica juncea* como planta acumuladora de metales.

- Se comparó la capacidad de *Brassica juncea* para el proceso de fitoextracción bajo condiciones controladas y en campo, resultando una mayor capacidad de acumulación de Zn en las plantas cultivadas en campo aplicando 50 mmoles/kg de ácido cítrico.
- La proyección de remediación reveló un tiempo aproximado de remediación de Zn de 35 años y de Pb de 11 años utilizando ácido cítrico a 50 mmoles/kg y *Brassica juncea* como planta acumuladora.
- Datos experimentales y de la literatura sugieren que mediante rotación de cultivos y prácticas agronómicas adecuadas y sustentables, es posible acelerar el tiempo de remediación de Zn en un 35% y de Pb en un 30% utilizando mostaza y maíz en un sistema de fitoextracción asistido químicamente por ácido cítrico a 50 mmoles/kg.
- Se determinaron los costos teóricos de la aplicación de la fitoextracción en campo (9000 USD anuales) encontrando una buena relación costo-beneficio comparado con otras técnicas de remediación de suelos contaminados por metales pesados, además de tener el potencial de obtener una ganancia económica haciendo el proceso sustentable.

CAPITULO 5
BIBLIOGRAFIA

5 BIBLIOGRAFIA

- **Angelova V., Ivanov K.**, 2009, Bio-accumulation and distribution of heavy metals in black mustard (*Brassica nigra* Koch), *Environmental Monitoring and Assessment*, 153, 449-459.
- **Araujo J. C. T., do Nascimento C. W. A.**, 2009, Phytoextraction of lead from soil from a battery recycling site: the use of citric acid and NTA, *Water Air and Soil Pollution*, in press.
- **Baker A. J. M., Reeves R. D., Ghaderian S. M., Mohtadi A., Rahiminejad R.**, 2007, Hyperaccumulation of nickel by two *Alyssum* species from the serpentine soils of Iran, *Plant and Soil*, 293, 91-97.
- **Bartholomew H. M., Underwood J. F.**, 1990, Brassicas for forage, Ohio State University, URL: <http://ohioline.osu.edu/agf-fact/0020.html>, 10/04/10.
- **Bekarem, S.A. de C.V.**, URL: <http://www.bekarem.com/>.
- **Beldin S. I., Caldwell B. A., Sollins P., Sulzman E. W., Lajtha K., Crow S. E.**, 2007, Cation exchange capacity of density fraction from paired conifer/grassland soils, *Biology and Fertility of Soils*, 43, 837-841.
- **Chaney R. L., Angle J. S., McIntosh M. S., Reeves R. D., Li Y. M., Brewer E. P., Chen K. Y., Roseberg R. J., Perner H., Synkowski E. C., Broad C. L., Broad C. L., Wang S. y A. J. M. Baker**, 2005, Using Hyperaccumulator Plants to Phytoextract Soil Ni and Cd, *Zeitschrift für Naturforschung*, 60, 190-198.

- **Chao Y. E., Feng Y., Yang X. E., Liu D.**, 2008, Effect of long-term stress of high Pb/Zn levels on genomic variation of *Sedum alfredii* Hance, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81, 445-448.
- **Chen H. M., C. R. Zheng, C. Tu, Z. G. Shen**, 2000, Chemical methods and phytoremediation of soil contaminated with heavy metals, *Chemosphere*, 41, 229-234.
- **Chen Y.X., Q. Lin, Y. M. Luo, Y. F. He, S. J. Zhen, Y. L. Yu, G. M. Tian, M. H. Wong**, 2003, The role of citric acid on the phytoremediation of heavy metal contaminated soil, *Chemosphere*, 50, 807-811.
- **Cui Y., Dong Y., Li H., Wang Q.**, 2004, Effect of elemental sulphure on solubility of soil heavy metals and their uptake by maize, *Environmental International*, 30, 323-328.
- **Curioni A., Arizio O.**, 2010, Margen bruto del cultivo de mostaza en la región pampeana-centro norte de Buenos Aires, URL: http://www.cappama.org.ar/mercados/MargenBruto_Mostaza_RegionPampeana_2009.pdf, 11/04/10.
- **Del Rio M., Font R., De Haro A.**, 2004, Heavy metal uptake by *Brassica* species growing in the polluted soils of Aznalcóllar (Southern Spain), *Fresenius Environmental Bulletin*, 13, 1439-1443.
- **do Nascimento C. W. A., Xing B., Amarasiriwardena D.**, 2006, Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil, *Environmental Pollution*, 140, 114-123.

- **do Nascimento C. W. A., Fontes R. L. F., Neves J. C. L.**, 1998, Mineral composition of two brazilian corn cultivars as a function of cadmium in the nutrient solution, *Journal of Plant Nutrition*, 21, 2369-2379.
- **do Nascimento C. W. A.**, 2006, Organic acids effects on desorption of heavy metals from a contaminated soil, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 63 (3), 276-280.
- **do Nascimento C., Freitas E., Silva A.**, 2009, The use of NTA and EDTA for lead phytoextraction from soil from a battery recycling site, *The Proceedings of the International Plant*, University of California.
- **Duke J. A.**, 1983, Handbook of energy crops URL: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/refa-f.html, 21/04/2010.
- **EPA** 2000, Introduction to Phytoremediation, EPA/600/R-99/107.
- **Epelde L., Hernandez Allica J. Becerril J. M., Blanco F., Garbisu C.**, 2008, Effects of chelates on plants and soil microbial community: Comparison of EDTA and EDDS for lead phytoextraction, *Science of the Total Environment*, 40, 21-28.
- **Evangelou M. W. H., 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.
- **Farwell A. J., Vesely S., Nero V., Rodriguez Hilda, Shah S., Dixon D. G., Glick B. R.**, 2006, The use of transgenic canola (*Brassica napus*) and

plant growth-promoting bacteria to enhance plant biomass at a nickel-contaminated field site, *Plant and Soil*, 288, 309-318.

- **Fassler E., Robinson B. H., Gupta S. K., Schulin R.**, 2010, Uptake and allocation of plant nutrients and Cd in maize, sunflower and tobacco growing on contaminated soil and the effect of soil conditioners under field conditions, *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, , in press
- **Galiulin R. V., Galilina R. A.**, 2008, Removing heavy metals from soil with plants, *Vestnik Rossiiskoi Akademii Nauk*, 78 (3), 247-249.
- **Ibáñez J. J.**, 2007, ph del suelo, URL: <http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2007/04/02/62776>, 15/04/2010.
- **Jurado Guerra Pedro, Luna Luna Miguel, Hernández Barretero Rodolfo**, 2004, Aprovechamiento de biosólidos como abonos orgánicos en pastizales áridos y semiáridos, *Técnica Pecuaria en México* 42 (3), 379-395.
- **Kayser A., Wenger K., Keller A., Attiger W., Felix H.R., Gupta S. K., Schulin R.**, 2000, Enhancement of phytoextraction of Zn, Cd, and Cu from calcareous soil: the use of NTA and sulphur amendments. *Environmental Science Technology*, 34, 1778-1783.
- **Keller C.**, 2006, Chapter 8 Factors limiting efficiency of phytoextraction at multi-metal contaminated sites, *Phytoremediation of Metal Contaminated Soils* 241-266.
- **Keller C., Hammer D., Kayser A., Richner W., Brodbeck M., Sennhauser M.**, 2002, Root development and heavy metal

phytoextraction efficiency: comparison of different plant species in the field, *Plant and Soil*, 249, 67-81.

- **Komarek M., Tlustos P., Szakova J., Chrastny V.**, 2007, The role of chloride salts in chemically enhanced phytoextraction of heavy metals from a contaminated agricultural soil, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 78, 176-180.
- **Koopmans G. F., Romkens P. F. A. M., Song J., Temminghoff E. J. M., Japenga J.**, 2007, Predicting the phytoextraction duration to remediate heavy metal contaminated soils, *Water Air and Soil Pollution*, 181, 355-371.
- **Korenkov V., Hirschi K., Crutchfield J. D., Wagner G. J.**, 2007, Enhancing tonoplast Cd/H antiport activity increases Cd, Zn, and Mn tolerance, and impacts root/shoot Cd partitioning in *Nicotiana tabacum* L., *Planta*, 226, 1379-1387.
- **Kumar P. B. A. N., Dushenkov V., Motto H., Raskin I.**, 1995, Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils, *Environmental science technology*, 29, 1232-1238.
- **La Jornada 2006**, Crean residencial para ricos sobre basurero de residuos tóxicos, *URL: <http://www.jornada.unam.mx/2006/08/04/index.php?section=estados&article=035n1est.15/12/2008>*.

- **Lambert M., Leven B. A., Green R. M.**, 2000, New methods of cleaning up heavy metals in soils and water, *Hazardous Substance Research Center*, in press.
- **Lesage E., E. Meers, P. Vervaeke, S. Lamsal, M. Hopgood, F. M. G. Tack, M. G. Verloo**, 2005, Enhanced phytoextraction: II. Effect of EDTA and citric acid on heavy metal uptake by *Helianthus Annuus* from a calcareous soil, *International Journal of Phytoremediation*, 7, 143-152.
- **Lestan D.**, 2006, Enhanced heavy metal phytoextraction, *Phytoremediation Rhizoremediation* 115-132.
- **Liu D., Li T., Yang X., Islam E., Jin X., Mahmood Q.**, 2007, Enhancement of lead uptake by hyperaccumulator plant species *Sedum alfredii* Hance using EDTA and IAA, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 78, 280-283.
- **Liu D., Islam E., Li T., Yang X., Jin X., Mahmood Q.**, 2008, Comparison of synthetic chelators and low molecular weight organic acids in enhancing phytoextraction of heavy metals by two ecotypes of *sedum alfredii* Hance, *Journal of Hazardous Materials*, 153, 114-122.
- **López-Chuken. U. J., Young S. D., Guzman M. J. L.**, 2010, Evaluating a “biotic ligand model” applied to chloride-enhanced Cd uptake by *Brassica juncea* from nutrient solution at constant Cd²⁺ activity, *Environmental Technology*, 31 (3), 307-318.
- **Maxted A. P., Black C. R., West H. M., Crout N. M. J., McGrath S. P., Young S. D.**, 2007, Phytoextraction of cadmium and zinc by *Salix* from

soil historically amended with sewage sludge, *Plant and Soil*, 290, 157-172.

- **McGrath S. P., Zhao F. J.**, 2004 Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 277-282.
- **Melo E. E. C., do Nascimento C. W. A., Accioly A. M. A., Santos A. C. Q.**, 2008, Phytoextraction and fractionation of heavy metals in soil after multiple applications of natural chelants *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66 (1), 61-68.
- **Mench M., Lepp N., Bert V., Schwitzguebel J. P., Gawronski S. W., Schroder P., Vangronsveld J.**, 2010, Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST action 859, *Journal of Soil and Sediments*, in press.
- **NOM-021-SEMARNAT-2000** Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis, URL: www.ingenieroambiental.com/mexico/NOM-021-REC NAT-2000.pdf, 17/oct/2008.
- **Nordberg G.**, 2001, Capitulo 63 metales: propiedades químicas y toxicidad, *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*, 2, 63.2-63.51.
- **Peña R. A., Nuñez H. G., González C. F.**, 2002, Potencial forrajero de poblaciones de maíz y relación entre atributos agronómicos con calidad, *Tecnica Pecuaria México*, 40 (3), 215-228.

- **PROY NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004** Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plomo, selenio, talio y vanadio, URL: [http://www.ordenjuridico.gob.mx/Federal/PE/APF/APC/SEMARNAT/Proyectos/111112005\(1\).pdf](http://www.ordenjuridico.gob.mx/Federal/PE/APF/APC/SEMARNAT/Proyectos/111112005(1).pdf), 21/oct/2008.
- **Qiao M., Cai C., Huang Y., Liu Y., Lin A., Zheng Y.**, 2010, Characterization of soil heavy metal contamination and potential health risk in metropolitan region of northern China, *Environmental Monitoring and Assessment*, in press.
- **Reetz H.**, 2001, Efficient fertilizer use soil sampling for high yield agriculture, URL: www.rainbowplantfood.com/agronomics/efu/sampling.pdf, 17/oct/2008.
- **Robinson B., Fernandez J. E., Madejon P., Marañón T., Murillo J. M., Green S., Clothier B.**, 2003, Phytoextraction: an assessment of biogeochemical and economic viability, *Plant and Soil*, 249, 117-125.
- **Salt D. E., R. D. Smith, I. Raskin**, 1998, Phytoremediation, *Annual Reviews*, 49, 643-668.
- **Schroder P., Memon A. R.**, 2009, Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation, *Environmental Science and Pollution Research*, 16, 162-175.
- **Schwartz C., Echeverria G., Morel J. L.**, 2003, Phytoextraction of cadmium with *Thlaspi caerulescens*, *Plant and Soil*, 249, 27-35.

- **Solhi M., Shareatmandari H., Hajabbasi M. A.**, 2005, Lead and zinc extraction potential of two common crop plants, *Heliantus annuus* and *Brassica napus*, *Water Air and Soil Pollution*, 167, 59-71.
- **Sun B., F. J. Zhao, E. Lombi, S. P. McGrath**, 2001, Leaching of heavy metals from contaminated soils using EDTA, *Environmental Pollution*, 113, 111-120.
- **The TNN Development Limited**, URL: http://tnn.en.alibaba.com/product/282077804-50399707/Citric_acid_anhydrous.html.
- **Todd A. Martin, Michael V. Ruby**, 2004, Review of in situ remediation technologies for lead, zinc and cadmium in soil, *Wiley Interscience* DOI: 10.1002/rem.20011, www.interscience.wiley.com.
- **Ulery A. L., R. Parra, M. P. Elless, M. J. Blaylock**, 2008, Transient phytoextraction agents: establishing criteria for the use of chelants in phytoextraction of recalcitrant metals, *International Journal of Phytoremediation*, 10, 415-429.
- **Van Hees P. A. W., Jones D. L., Godbold D. L.**, 2003, Biodegradation of low molecular weight organic acids in limed forest soil, *Water Air and Soil Pollution*, 3, 121-144.
- **Vehlow J., Mark F. E.**, 2003 Influence of bromine on metal volatilization in waste combustion, *Journal Mater Cycles Waste Management*, 2, 89-99.

- **Vyslouzilova M., Tlustos P., Szakova J.**, 2003., Cadmium and zinc phytoextraction potential of seven clones of *Salix* spp. planted on heavy metal contaminated soils, *Plant Soil and Environment*, 49 (12), 542-547.
- **Weigmann D. L., Helfrich L. A., Hipkins P., Stinson E. R.**, 2009, Pesticides and aquatic animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems, URL: <http://www.pubs.ext.vt.edu/420/420-013/420-013.html#TOC>, 8/03/2010.
- **Wenger K., Gupta S. K., Furrer G., Schuli R.**, 2002, Zn extraction potential for two common crop plants, *Nicotiana tabacum* and *Zea mays*, *Plant and Soil*, 242, 217-225.
- **Wenzel, W. W., Unterbrunner R., Sommer P., Sacco P.**, 2003, Chelate-assisted phytoextraction using canola (*Brassica napus* L) in outdoors pot and lysimeter experiments, *Plant and soil*, 249, 83-96.
- **Wieshammer G., Unterbrunner R., Garcia T. B., Zivkovic M, F., Markus P., Wenzel W. W.**, 2007, Phytoextraction of Cd and Zn from agricultural soils by *Salix* spp. And intercropping of *Salix caprea* and *Arabidopsis halleri*, *Plant and Soil*, in press.
- **Wu Q. T., Wei Z. B., Ouyang Y.**, 2007, Phytoextraction of metal contaminated soil by *Sedum alfredii* H: effects of chelator and co-planting, *Water Air and Soil Pollution*, 180, 131-139.
- **Zhao F. J., Lombi E., McGrath S. P.**, 2003, Assessing the potential for zinc and cadmium phytoremediation with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Plant and Soil*, 249, 37-43.

- **Zhuang P., Ye Z. H., Lan C. Y., Xie Z. W., Shu W. S.,** 2005, Chemically assisted phytoextraction of heavy metal contaminated soils using three plant species, *Plant and Soil*, 276, 153-162.
- **Zhuang P., Yang Q. W., Wang H. B., Shu W. S.,** 2007, Phytoextraction of heavy metals by eight plant species in the field, *Water Air and Soil Pollution*, 184, 235-242.