



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencias Ambientales

Evaluación de la utilidad de la mostaza de la India (*Brassica juncea*) para la descontaminación de un suelo calizo contaminado por plomo, níquel y cobre

Evaluation of the usefulness of Indian mustard (*Brassica juncea*) for the decontamination of a limestone soil contaminated by lead, nickel and copper

Autora

Isabel Sarría Cebrián

Director/es

Oriol Ortiz Perpiña
Raquel Zufiarre Galarza

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR

2021

Agradecimientos:

Aprovecho este espacio para agradecer a mi familia y amigos su enorme apoyo y comprensión durante este periodo de tiempo. A mis tutores Oriol y Raquel por su esfuerzo y trabajo, así como a José Antonio Manso, Begoña Portaña, Inmaculada Palacín (personal de laboratorio) y Héctor Gómez (alumno que preparó el suelo utilizado en el trabajo) sin todos ellos este proyecto no habría llegado a buen puerto.

índice

1	RESUMEN/ ABSTRACT	1
2	INTRODUCCION.....	3
2.1	Contaminación de los suelos.....	3
2.2	Origen y consecuencias de la contaminación en el suelo por elementos metálicos.....	3
2.3	Tratamientos de descontaminación.....	4
2.4	Fitorremediación. Eficacia de Brassica juncea	6
2.5	Objetivos.....	9
3	MATERIAL Y MÉTODOS	10
3.1	Diseño experimental	10
3.1.1	Origen del suelo, procedimiento de contaminación y envejecimiento.....	10
3.1.2	Procedimiento de siembra y germinación	12
3.1.3	Recolección y conservación del material vegetal.....	12
3.2	Determinaciones analíticas	14
3.2.1	Determinación del pH en extracto acuoso y extracto con KCl.....	14
3.2.2	Determinación de la conductividad eléctrica (CE).....	15
3.2.3	Determinación de la materia orgánica (MO).....	15
3.2.4	Caracterización del suelo.....	16
3.2.5	Determinación de metales en metales en el suelo: Extracciones secuenciales (metodología de Tessier)	16
3.2.6	Determinación de metales en plantas (<i>B.juncea</i>).....	19
3.2.7	Estimación de la cobertura vegetal mediante análisis de imágenes	19
3.3	análisis de datos	20
3.3.1	Análisis de varianza (ANOVA).....	20
3.3.2	Análisis de componentes principales (ACP)	20
4	RESULTADOS	21
4.1	Concentración de metales en el suelo	21
4.2	Concentración de metales en <i>B.juncea</i>	24
4.3	Efecto de la contaminación por Cu, Ni y Pb en el desarrollo de Brassica juncea	25
4.4	Factores de concentración (FC) y extracción de metales en el suelo	25
4.5	Análisis de componentes principales (ACP)	26
5	DISCUSIÓN.....	29
5.1	Distribución de los metales en el suelo.....	29
5.2	Extracción de metales por parte de <i>B.juncea</i>	30
5.3	Eficacia del proceso de extracción.....	31
5.4	Conclusiones	32
6	REFERENCIAS	33

Índice de figuras

Figura 1. Representación de los diferentes mecanismos de biorremedición

Figura 2. Plantas en el suelo control en el momento de la recolección

Figura 3. Plantas en el suelo contaminado en el momento de la recolección

Figura 4. Material vegetal correspondiente a las 5 macetas de cada bandeja tras el secado. Controles, contaminado 1 y contaminado 2 (de arriba abajo)

Figura 5. Método extracciones secuenciales de Tessier

Figura 6. Residuo mineral tras la calcinación del material vegetal sobre la placa calefactora.

Figura 7. Foto cenital (control y contaminado)

Figura 8. Distribución de metales (%) por fracciones en el suelo en función del tipo de contaminación.

Figura 9. Factor de concentración (FC) para Cu, Ni y Pb teniendo en cuenta los diferentes tipos de contaminación (ANOVA).

Figura 10. Proyección de las variables estudiadas sobre el plano definido por los componentes principales 1 (79% de la varianza) y 2 (14% de

Figura 11. Proyección de las muestras estudiadas sobre el plano definido por los componentes principales 1 (79% de la varianza) y 2 (14% de la varianza).

Índice de tablas

Tabla 1. Niveles genéricos de referencia para metales en suelos de Aragón en función de su uso (B.O.A nº 75, 2008).

Tabla 2. Diseño experimental: contaminación y distribución del suelo (O, C1 y C2). Los tratamientos se realizaron por duplicado.

Tabla 3. Características químicas del suelo experimental. (media \pm desviación).

Tabla 4. Condiciones de medida y calibrado para cada metal mediante EAA-llama.

Tabla 5. Concentración nominal de Cu, Ni y Pb y medida en el suelo (promedio \pm desviación estándar, n=2) tras la maduración.

Tabla 6. Concentración de metales en las 5 fracciones del suelo consideradas en el método de Tessier (promedio \pm desviación estándar, n=2).

Tabla 7. Resultados del análisis de varianza de la distribución por fracciones de los metales considerados en este trabajo, en función del nivel de contaminación del suelo. Se adjunta para cada análisis el valor de p correspondiente. Para un mismo metal y nivel de contaminación, letras distintas indican la existencia de diferencias significativas entre fracciones.

Tabla 8. Concentraciones de Cu, Ni y Pb en los tejidos vegetales aéreos (tallos y hojas) (media \pm sd, n=2).

Tabla 9. Relación entre el tipo de contaminación y la concentración de metales en plantas (media \pm sd). Se incluye, para cada análisis, el valor de p obtenido en el análisis de varianza.

Tabla 10. Resultados de los análisis de regresión lineal entre las concentraciones totales y asimilables (fracción F1) de los metales en el suelo y las concentraciones en los tejidos vegetales.

Tabla 11. Resultados de los análisis de varianza del nivel de contaminación del suelo sobre los indicadores de desarrollo vegetal: germinación, peso por planta, altura máxima promedio, cobertura y producción vegetal. Se incluyen en la tabla los valores de p obtenidos en los respectivos análisis.

Tabla 12. Resultados del análisis de varianza del Factor de Concentración (FC) para Cu, Ni y Pb en función del nivel de contaminación del suelo.

Tabla 13. Análisis de varianza de la extracción vegetal de Cu, Ni y Pb en función del tipo de contaminación.

Tabla 14. Coeficientes de correlación de las variables incluidas en el análisis de componentes principales con los componentes 1 y 2.

1 RESUMEN / ABSTRACT

Evaluación de la utilidad de la mostaza de la India (*Brassica juncea*) para la descontaminación de un suelo calizo contaminado por plomo, níquel y cobre

RESUMEN

La contaminación por metales pesados ocasiona una problemática particular del suelo por su imposibilidad de biodegradación. Muchas de las técnicas de descontaminación, aunque reducen su concentración, causan una importante perturbación del suelo.

La fitoextracción es una técnica que permite compatibilizar la extracción de metales con la mejora de la calidad del suelo. Consiste en el uso de plantas que extraen metales del suelo y los almacenan en sus partes cosechables, lo que facilita su recolección.

Una especie muy utilizada recientemente es la mostaza de la india (*Brassica juncea*), por su capacidad de acumulación simultánea de numerosos metales y su adaptabilidad a condiciones edáficas diversas.

Se llevó a cabo un estudio para evaluar la capacidad de *B. juncea* en un proceso de fitorremediación de Plomo, Níquel y Cobre. En un suelo calizo contaminado artificialmente, se sembró y se cultivó durante 45 días.

Las plantas absorbieron cantidades apreciables de los tres metales, aunque los factores de concentración fueron siempre inferiores a 1 en los suelos contaminados. Su desarrollo fue, además, muy escaso, con una producción tan reducida que lleva a concluir que esta especie no es adecuada para este tipo de prácticas sobre este suelo y en las concentraciones estudiadas.

PALABRAS CLAVE: biodisponibilidad, *Brassica juncea*, contaminación de suelos, desarrollo vegetal, fitoextracción, metal pesado.

Evaluation of the usefulness of Indian mustard (*Brassica juncea*) for the decontamination of a limestone soil contaminated by lead, nickel and copper

ABSTRACT

Contamination by heavy metals causes a particular problem in the soil because they are not biodegradable. Many decontamination techniques, while reducing their concentration, cause significant soil disturbance.

Phytoextraction is a technique that allows the extraction of metals while improving soil quality. It consists of the use of plants that extract soil metals and store them in their harvestable parts, which facilitates their collection.

Indian mustard (*Brassica juncea*) has been widely used for this purpose, due to its capacity for simultaneous accumulation of several metals and its adaptability to diverse soil types.

We carried out a study to assess the capacity of *B. juncea* in a lead, nickel and copper phytoremediation process. In an artificially polluted limestone soil, it was sown and cultivated for 45 days.

The plants assimilated appreciable amounts of the three metals, although the concentration factors were always less than 1 in all the polluted soils. Plant growth was also very scarce, with such a low production that leads to conclude that this species is not suitable for phytoextraction on this soil type at the studied concentrations.

KEY WORDS: bioavailability, *Brassica juncea*, heavy metal, phytoextraction, plant development, soil pollution.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Contaminación de los suelos

El suelo se encuentra en equilibrio entre procesos que actúan en direcciones opuestas de formación y degradación, pero este puede romperse originando degradación acelerada. Éste desempeña una gran variedad de funciones ecosistémicas lo que le permite jugar un papel crítico en cuestiones como el mantenimiento de la calidad del aire, el almacenamiento de agua y nutrientes para las plantas y microorganismos y como medio purificador de contaminantes mediante procesos físicos, químicos y biológicos.

La contaminación del suelo sucede cuando recibe elementos o sustancias en concentraciones que superan su capacidad natural de autodepuración, causando una alteración en su funcionamiento normal.

Se determina como suelo contaminado aquel cuyas características físicas, químicas o biológicas han sido alteradas negativamente por la presencia de componentes en concentraciones que suponen un riesgo para la salud humana de acuerdo a lo que establece la legislación vigente en el Real Decreto 9/2005, de 14 de enero de 2005 y la Ley 22/2011 de 28 de julio de Residuos y Suelos Contaminados, en el que se establecen las actividades potencialmente contaminantes y los criterios para declarar suelos contaminados.

Para determinar un suelo como contaminado también se tienen en cuenta los niveles genéricos de referencia (NGR), que se refieren a la concentración de una sustancia contaminante en el suelo que puede generar el mayor nivel de riesgo admisible para la salud humana y los ecosistemas (IGME, n.d.). El NGR es, pues, un nivel de alerta que indica que puede existir un riesgo ecotoxicológico no admisible que, en cualquier caso, hay que valorar.

2.2 Origen y consecuencias de la contaminación en el suelo por elementos metálicos

La contaminación por metales pesados ocasiona una problemática particular en los suelos, por su imposibilidad de biodegradación y el hecho que muchos elementos metálicos pueden acumularse en el suelo en formas poco biodisponibles. Se define como metal pesado cualquier elemento metálico cuyo peso específico es mayor de 5 g/cm³ o su número atómico superior a 20. Todos los metales existen de forma natural, pero en concentraciones mínimas que no causan efectos adversos (García et al., 2002).

Así pues, los metales pesados en el suelo pueden ser de origen geogénico o antropogénico. Los geogénicos proceden de la alteración del material parental por procesos químicos, físicos o biológicos durante la edafogénesis, y son los que pasan del material parental al suelo.

Por el contrario, los antropogénicos son los que tienen su origen en vertidos relacionados con actividades antrópicas como la industria metalúrgica, la combustión de determinados combustibles fósiles, o ciertas actividades agrarias, entre otras. Constituyen la mayor aportación en suelos contaminados, y pueden llegar a ser tóxicos según su concentración y su biodisponibilidad, causando efectos adversos muy variados, letales o subletales, en los seres vivos (Galán Huertos and Romero Baena, 2008).

Este doble origen de los metales en los suelos implica la necesidad, en trabajos de evaluación de la contaminación, de discriminar entre la porción naturalmente presente en el suelo y la porción procedente de actividades contaminantes. De esta forma, los niveles de fondo se definen como la concentración de una sustancia, presente de forma sistemática en el medio natural, que no ha sido influenciada por actividades humanas localizadas (IGME, n.d.).

De forma general, se puede afirmar que cuando las concentraciones reales de un metal en el suelo exceden los niveles de fondo, y además esto causa un daño al funcionamiento normal del suelo, por ejemplo, causando mortalidad o disfunciones en los organismos vivos, el suelo puede considerarse contaminado. Desde un punto de vista legal, la declaración de suelo contaminado genera automáticamente la necesidad de emprender labores de saneamiento del suelo.

La biodisponibilidad y movilidad de un elemento depende de las características del suelo donde se encuentra, así como de la forma química en la que se encuentran. Sin embargo, la movilidad de los metales en el suelo suele ser baja, quedando acumulados en los primeros centímetros del suelo (Galán Huertos and Romero Baena, 2008). Los principales atributos edáficos que actúan sobre la biodisponibilidad de los elementos metálicos son:

- El pH, ya que los metales tienden a estar más disponibles en un suelo ácido al ser menos fuertemente absorbidos (exceptuando As, Mo, Se, Cr).
- Su capacidad de intercambio catiónico (CIC), los suelos arcillosos retienen más metales al ser adsorbidos.
- Materia orgánica (MO) que, además de generar capacidad de intercambio catiónico, reacciona con los metales formando complejos organometálicos, pudiendo ser tan fuertemente adsorbidos que queden estabilizados como el Cu o formen quelatos estables como el Pb.
- Las condiciones redox, el metal se puede encontrar oxidado o reducido
- Presencia de carbonatos que garantizan un alto pH lo que hace que los metales precipiten.
- La salinidad, si esta aumenta se puede incrementar la movilización.

2.3 Tratamientos de descontaminación

Las técnicas de remediación pueden ser físicas, químicas o biológicas y suelen usarse en combinación secuencial, denominada tren de procesos, para lograr una recuperación más económica y eficaz.

Remediación física:

- Reemplazo del suelo: Reemplazamos el suelo contaminado por otro que no lo esté. Así diluimos la concentración de los metales pesados en el suelo aumentando su funcionalidad.

- Aislamiento del suelo: Se logra colocando una capa de material impermeable como la arcilla debajo de la región contaminada del suelo. Es muy útil para evitar la contaminación de las aguas subterráneas.
- Vitrificación: En la vitrificación una corriente eléctrica pasa a través del suelo insertando verticalmente electrodos en el área contaminada. Esta técnica es aplicable a grandes volúmenes de tierra y la temperatura es un factor clave.
- Remediación electrocinética: Separa los metales mediante electroforesis, filtración eléctrica o electro-migración disminuyendo así la contaminación

Remediación química:

- Técnicas de inmovilización: Disminuyen la movilidad del metal y su biodisponibilidad en el suelo mediante la adición de agentes inmovilizadores al suelo, dando como resultado reacciones de formación de complejos, precipitación y adsorción que provoca la redistribución de los metales partículas sólidas limitando su transporte y biodisponibilidad. Se lleva a cabo con el aporte de enmiendas orgánicas e inorgánicas. Siendo las más comunes las que incluyen cemento, arcilla, zeolitas, fosfatos, minerales y microbios.
- Encapsulación: Se mezcla el suelo contaminado con otros productos como hormigón, cal o asfalto volviéndolo inmóvil y evitando la contaminación de los materiales circundantes. Además, previene la lixiviación de materiales orgánicos.
- Lavado del suelo: Se utilizan reactivos y extractantes que pueden lixiviar los metales pesados del suelo. Se mezclan la solución y la extracción durante un tiempo determinado y a través de la precipitación, el intercambio de iones, la quelación o la adsorción los metales se transfieren a la fase líquida y posteriormente se separan por lixiviado. Se pueden utilizar agentes quelante sintéticos como el EDTA, ácidos orgánicos sustancias húmicas, tensoactivos y ciclodextrina.

Remediación Biológica o Biorremediación:

Nace del uso de microorganismos o plantas para detoxificar o eliminar contaminantes del suelo, la biorremediación es rentable, económica, no invasiva, y proporciona una solución permanente.

- Fitorremediación: Es el mecanismo por el cual las plantas pueden inmovilizar, degradar o eliminar metales.
- Fitovolatilización: La planta absorbe los metales del suelo y los convierte en vapores menos tóxicos que posteriormente se liberan a la atmósfera a través del proceso de transpiración. Estos metales son asimilados en compuestos orgánicos volátiles (COVs) que se liberan a la atmósfera como biomoléculas.

- **Fitoestabilización:** Se usan las plantas para disminuir la disponibilidad y movilidad de los metales pesados en el suelo, esta técnica no reduce la concentración de metales, sino que limita ese movimiento pudiendo hacerlo de varias formas: Reduciendo la lixiviación, reduciendo la erosión del suelo estabilizándolo con las raíces y disminuyendo la escorrentía.
- **Fitoextracción:** Este método implica limpieza de los metales pesados del suelo mediante la absorción por parte de las plantas. Se basa en la capacidad de las raíces de las plantas para absorber trasladar y concentrar metales pesados a las partes aéreas de la planta dando como resultado una disminución de la masa contaminada. Durante el proceso los metales pesados se transfieren del suelo la biomasa vegetal que es muy fácil de tratar en comparación con el suelo y esto garantiza una eliminación permanente de los metales, aunque no todas las especies de plantas pueden utilizarse.
- **Fitorremediación asistida por microbios:** Referida al uso de microorganismos para inducir la absorción, precipitación, oxidación y reducción de metales pesados en el suelo.

A continuación, en la Figura 1, podemos ver una representación esquemática de cada una de ellas

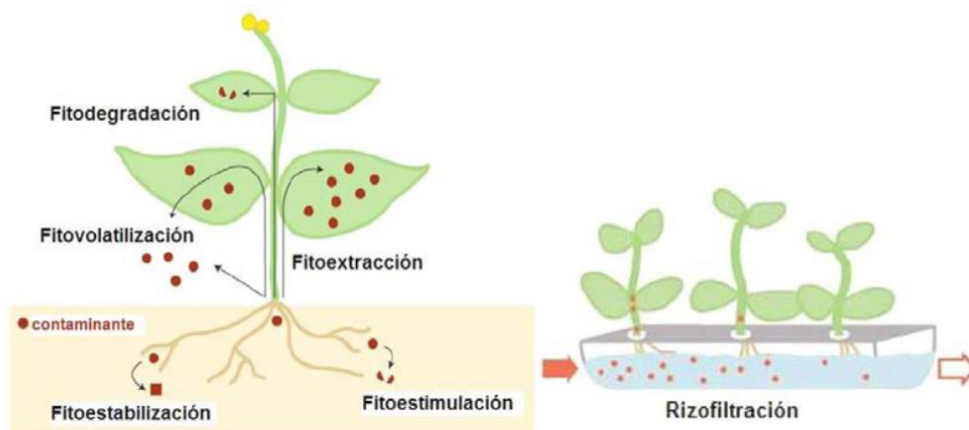


Figura 1. Representación de los diferentes mecanismos de biorremediación (Sanz,2015)

2.4 Fitorremediación. Eficacia de *Brassica juncea*

En la actualidad existen numerosos métodos para tratar suelos contaminados por metales. Sin embargo, la mayoría de los métodos físicos o químicos son muy agresivos y, aunque reducen la concentración de metales, causan una alteración significativa a los atributos físicos, químicos y biológicos del suelo.

En suelos como los de la Hoya de Huesca, con contenidos de carbonatos que con frecuencia no son inferiores al 30 o 40%, la descarbonatación previa a un lavado ácido de los metales, por ejemplo, implica la destrucción de una tercera parte del suelo, si no más, y la alteración de todos los atributos que el suelo hereda de estos componentes.

En este contexto, las técnicas de fitoextracción pueden constituir una forma viable de compatibilizar la extracción progresiva de los metales pesados y la mejora de su calidad. La fitoextracción consiste en el uso de plantas que extraen los metales del suelo y los almacenan en partes cosechables, de tal forma que, con una alteración mínima del suelo, se pueda alcanzar gradualmente el objetivo de la descontaminación (Ali et al., 2013).

Todo el mecanismo de fitoextracción de metales pesados tiene cinco aspectos básicos: (1) movilización de los metales pesados en el suelo, (2) absorción de los iones metálicos por las raíces de las plantas, (3) translocación de los metales acumulados desde las raíces a los tejidos aéreos, (4) secuestro de los iones metálicos en la planta y (5) tolerancia a metales. La tolerancia a los metales es un requisito previo clave para la acumulación de metales y, por lo tanto, la fitorremediación.

Las plantas llevan los metales pesados de la solución del suelo a sus raíces. Después de entrar en las raíces, los iones de metales pesados pueden almacenarse en ellas o se trasladan a los brotes principalmente a través de los vasos del xilema (Prasad, 2004; Jabeen et al., 2009), hasta los tallos, hojas o frutos, donde se depositan principalmente en vacuolas (Ali et al., 2013).

La eficacia de fitoextracción depende de muchos factores, como la biodisponibilidad de los metales en el suelo, las propiedades del suelo, la especiación de los metales pesados y las especies de plantas.

Las plantas aptas para la fitoextracción deben tener, idealmente, las siguientes características: (1) alta tasa de crecimiento, (2) producción de más biomasa aérea que subterránea, (3) sistema de raíces ampliamente distribuido y altamente ramificado, (4) mayor acumulación de los metales pesados en planta que en suelo, (5) translocación de los metales pesados acumulados de raíces a brotes, (6) tolerancia a los efectos tóxicos de los metales pesados objetivo, (7) buena adaptación a las condiciones ambientales y climáticas imperantes, (8) resistencia a patógenos y plagas, (9) fácil cultivo y cosecha, y (10) repulsión a los herbívoros para evitar la contaminación de la cadena alimentaria (Sanz, 2015).

Así pues, el potencial de fitoextracción de una especie vegetal se determina principalmente por dos factores: la concentración de metales en los brotes y la biomasa producida por la planta. Sin embargo, hiperacumulación e hipertolerancia son más importantes en la fitorremediación que una elevada producción de biomasa. Las plantas hiperacumuladoras tienen el potencial de acumular metales pesados en sus brotes a unos niveles que son tóxicos para otras plantas, gracias a haber desarrollado evolutivamente mecanismos eficaces de detoxificación.

El término hiperacumuladora se acuñó por primera vez para describir plantas con concentraciones de Ni superiores a 1000 mg/kg de peso seco. Actualmente se consideran plantas hiperacumuladoras las que pueden acumular en su biomasa aérea más de 100mg de Cd o Se, más de 1000mg/kg de Pb, Ni, Co o Cu, más de 10000 mg/kg de Mn o Zn (Bluskov et al., 2005).

Las plantas hiperacumuladoras se caracterizan por su porción de raíces en relación con la masa vegetal, y la transpiración más intensa y un crecimiento lento. Por ello su uso efectivo para descontaminar es limitado. Para potenciar la fitorremediación se pueden usar agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o ácido dietilentriamino pentaacético (DTPA) (Mahar et al., 2016).

El uso de hiperacumuladores producirá una biomasa rica en metales y de bajo volumen, que es económica y fácil de manipular en caso de recuperación de metales y eliminación segura. Por otro lado, el uso de no acumuladoras producirá una biomasa de gran volumen pero más pobre en metales, que será antieconómico de procesar para la recuperación de metales y también costosa de eliminar de forma segura (Kabata-Pendias, 2004).

La mostaza de la India (*Brassica juncea* (L.) Czern and Coss), forma parte de la familia *Brassicaceae*, que se caracteriza por poder acumular grandes cantidades de metales en raíces y brotes. Puede alcanzar 1 m de alto y sus raíces alcanzar una profundidad de 90-120 cm, tiene un tallo cilíndrico y glauco ramificado, posee hojas inferiores con peciolo largo y superiores con o sin peciolo. Sus flores son bisexuales, de color amarillo brillante con 6 estambres. Puede tolerar precipitaciones elevadas y pH de 4,3 a 8,3 (Hernández Zamora, 2009).

Produce elevada biomasa incluso en suelos que contienen metales como contaminantes, crece fácilmente en diversas localidades y climas. Es especialmente efectiva con el Pb, que se concentra en las raíces y restringe en gran medida su translocación a los brotes (Singh et al., 2016).

La fitorremediación presenta algunas limitaciones: la escasez de especies vegetales utilizables y que en ocasiones pueden afectar a la biodiversidad local. El escaso crecimiento y biomasa de la mayor parte de estas especies ralentizando el proceso. El excesivo tiempo que se requiere para la recuperación del suelo. La dificultad de movilizar la fracción de iones metálicos más fuertemente unidos al sustrato limitando su biodisponibilidad. Es aplicable a sitios con niveles bajos o moderados de contaminación por metales porque el crecimiento de estas plantas no es posible en suelos muy contaminados. Además hay riesgo de contaminación de la cadena alimentaria (Sanz, 2015).

Aunque la fitoextracción es una técnica ampliamente estudiada y documentada, tanto en trabajos de descontaminación como en actividades de fitominería, su uso en suelos fuertemente carbonatados como son los suelos predominantes en Aragón y con niveles de contaminación no excesivamente elevados no ha sido lo suficientemente estudiado, por lo que constituye el objetivo principal de este trabajo.

Este objetivo se alinea plenamente con los Objetivos de Desarrollo Sostenible propuestos por las Naciones Unidas y particularmente con los siguientes objetivos:

Objetivo 3: Agua limpia y saneamiento

3.9 Para 2030, reducir sustancialmente el número de muertes y enfermedades producidas por productos químicos peligrosos y la contaminación del aire, el agua y el suelo.

Objetivo 15: Gestionar sosteniblemente los bosques, luchar contra la desertificación, detener e invertir la degradación de las tierras, detener la pérdida de biodiversidad

15.1 Para 2020, velar por la conservación, el restablecimiento y el uso sostenible de los ecosistemas terrestres y los ecosistemas interiores de agua dulce y los servicios que proporcionan, en particular los bosques, los humedales, las montañas y las zonas áridas, en consonancia con las obligaciones contraídas en virtud de acuerdos internacionales.

15.3 Para 2030, luchar contra la desertificación, rehabilitar las tierras y los suelos degradados, incluidas las tierras afectadas por la desertificación, la sequía y las inundaciones y procurar lograr un mundo con una degradación neutra del suelo

2.5 Objetivos

El objetivo general del trabajo es valorar la eficacia de *Brassica juncea* para extraer y acumular los metales pesados contenidos en un suelo calizo contaminado previamente con Pb, Ni y Cu.

Los objetivos específicos planteados son los siguientes:

- Determinar las concentraciones de Pb, Ni y Cu en las partes aéreas de *Brassica juncea* en un suelo calizo contaminado con estos tres metales.
- Determinar las concentraciones totales y la distribución en fracciones de distinta biodisponibilidad de Pb, Ni y Cu en el suelo contaminado.
- Evaluar el efecto de la contaminación del suelo sobre la germinación y el crecimiento de *B. juncea*.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 *Diseño experimental*

3.1.1 Origen del suelo, procedimiento de contaminación y envejecimiento

Para la realización de este trabajo se ha utilizado un suelo contaminado y envejecido en un trabajo previo. A continuación, se expone el procedimiento seguido.

Se eligió un suelo del invernadero de la EPS con el objetivo de trabajar en condiciones controladas tanto de contaminación del suelo como de crecimiento y desarrollo de la planta, siendo los resultados extrapolables a una amplia diversidad de suelos de Aragón que puedan presentar un problema de contaminación.

Se tomaron unos 30 kg de sustrato y se mezcló con turba en proporción 2:1 (en volumen) ya que este suelo presentaba un bajo contenido en materia orgánica (M.O). Se secó a temperatura ambiente y se tamizó con una malla de 2 mm. Esta mezcla homogénea de suelo se distribuyó en 6 bandejas con 5 kg de suelo en cada una. Estas bandejas se corresponden con los 3 tratamientos aplicados al suelo (por duplicado) para su contaminación: Control (O), Contaminado 1 (C1) y Contaminado 2 (C2).

Para el diseño del experimento las concentraciones que se toman de Cu y Pb (Tabla 1) se corresponden con los niveles genéricos de referencia (NGR) para la protección de la salud humana de la comunidad autónoma de Aragón para suelos de uso industrial (B.O.A nº 75, 2008). Sin embargo, para el Ni la concentración tomada es mucho menor que la que establece la legislación. Ello es debido a que en unos bioensayos de germinación con semillas de *Brassica juncea* realizados en un trabajo previo (Vaquero, 2019), se comprobó que la concentración efectiva 50 (EC50) para este metal es mucho menor de lo que establece su NGR, por lo que se estableció una concentración de 280 mg/kg (C1) y una concentración máxima de 560 mg/kg (C2) para evitar problemas de germinación causados por este metal.

Tabla 1. Niveles genéricos de referencia para metales en suelos de Aragón en función de su uso (B.O.A nº 75, 2008)

ELEMENTO	INDUSTRIAL (mg/kg)	AREA DE JUEGO INFANTIL (mg/kg)	URBANO (mg/kg)	OTROS USOS DEL SUELO (mg/kg)	VR 90 (mg/kg)
Aluminio	10000 ^c	10000 ^c	10000 ^c	8185 ^a	8185
Antimonio	300 ^b	30	30	3 ^a	3
Arsénico	260 ^b	26 ^a	26 ^a	26 ^a	26
Bario	10000 ^c	8900 ^b	8900 ^b	890 ^b	890
Berilio	10 ^b	1	1	0,8	
Cadmio	100 ^b	10 ^b	10 ^b	1	0,4
Cobalto	1500 ^b	150 ^b	1500 ^b	15 ^a	15
Cobre	2800 ^b	280 ^b	280 ^b	28 ^a	28
Cromo (III)	10000 ^c	10000 ^b	10000 ^c	1000	80
Cromo (VI)	2300 ^b	200	230	80 ^a	80
Estaño	10000 ^c	10000 ^c	10000 ^c	3185	4
Hierro	10000 ^c	10000 ^c	10000 ^c	3750 ^a	3750
Manganeso	10000 ^c	3100	3390	71 ^a	715
Mercurio	250 ^b	20	25	0,36	0,06
Molibdeno	300 ^b	30 ^b	30 ^b	3	3
Niquel	4000 ^b	400 ^b	400 ^b	40	40
Plata	100 ^b	10 ^b	10 ^b	1	0,97
Plomo	2700 ^b	270	270	45	36
Selenio	2000 ^b	200 ^b	200 ^b	20	3
Talio	20 ^b	0,5	2	0,08	
Torio	18	18	18	18	17
Uranio	450 ^b	45	45	7 ^a	7
Vanadio	10000 ^b	1000 ^b	1000 ^b	100 ^a	100
Zinc	10000 ^c	4200 ^b	4200 ^b	420	130

Los metales pesados seleccionados, Pb, Ni y Cu, se añaden al sustrato en forma de sales disueltas: $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ para conseguir las diferentes concentraciones nominales para cada tratamiento (Tabla 2). Para el C1 se añadió una concentración de 2700, 280 y 2800 mg/kg respectivamente de Pb, Ni y Cu para el C2 se contaminó con el doble de concentración que el C1.

Para los suelos O y C1, se añadió una cantidad equivalente de nitrógeno a las añadidas al suelo contaminado C2 a partir de una disolución de NH_4NO_3 , con el objetivo de evitar que hubiera diferencias en el desarrollo vegetal atribuibles a distintas disponibilidades de N.

Tras el dopaje se pasa al envejecimiento de los suelos que se mantienen durante 1 mes a temperatura ambiente, en ciclos continuos de humectación y desecación, homogeneizando el contenido de las bandejas 3 veces por semana. Tras dicho periodo, el suelo permaneció en el laboratorio durante un año aproximadamente hasta su utilización para la realización del presente trabajo.

Tabla 2. Diseño experimental: contaminación y distribución del suelo (O, C1 y C2). Los tratamientos se realizaron por duplicado.

Muestra	Dosis nominal Cu (mg/kg)	Dosis nominal Ni (mg/kg)	Dosis nominal Pb (mg/kg)	Complemento de NH ₄ NH ₃ (g)	Número de macetas
O1	0	0	0	74,3	5
O2	0	0	0	74,3	5
C1.1	2800	280	2700	37,1	5
C1.2	2800	280	2700	37,1	5
C2,1	5600	560	5400	0	5
C2.1	5600	560	5400	0	5

3.1.2 Procedimiento de siembra y germinación

El suelo de cada bandeja (tratamiento) se distribuyó en 5 macetas de 1 kg de capacidad. Por lo tanto, se dispuso de un total de 30 macetas, 10 para cada nivel de contaminación. Las macetas se colocaron sobre un plato de plástico para evitar pérdidas de metales y nutrientes por lavado. Se realizó una primera siembra con 20 semillas de *B. juncea* y posteriormente dos resiembras de 20 y 10 semillas por maceta, puesto que las semillas germinaron en proporciones muy bajas. El tiempo de germinación fue aproximadamente de 3 semanas.

Tras la siembra las macetas se trasladaron a una cámara de cultivo a 25 °C y con un fotoperiodo de 12 horas.

Las macetas estuvieron en la cámara durante un mes y medio (ciclo vegetativo de *B. juncea*), hasta que los controles empezaron con la floración. Durante ese tiempo se regaron una vez por semana adicionando agua destilada en la base de la maceta (plato de plástico), evitando así la proliferación de hongos y la perturbación física del suelo.

3.1.3 Recolección y conservación del material vegetal

La toma de muestras del material vegetal se llevó a cabo pasado un mes y medio, motivado por dos causas. Por un lado, las plantas de los controles estaban floreciendo, lo que indicaba que *B. juncea* estaba acabado su ciclo vegetativo (Figura 2). Por otra parte, las plantas presentes en las macetas de los suelos contaminados estaban siendo afectadas por clorosis (inhibición de la síntesis de clorofila) presentando un color rojizo y por necrosis (Figura 3) (muerte de la parte exterior de las hojas), inducida probablemente por los contaminantes metálicos.

Para la toma de muestras se procedió de la siguiente manera: se contó para cada una de las macetas el número de plantas, se midió su altura máxima y se tomó una fotografía cenital de cada maceta. A partir de estos datos se pudieron obtener otros indicadores del desarrollo vegetal como el % de germinación (sobre una base de 50 semillas por maceta) y la cobertura vegetal mediante fotointerpretación.

La recolección se realizó cortando las plantas a ras de suelo (parte aérea, tallo y hojas), excluyendo las raíces. A continuación, el material vegetal se depositó en sobres etiquetados que se dejaron secar en la estufa a 60°C durante 48 horas. Pasado este tiempo se pesó el contenido de los sobres.

Como la cantidad de muestra obtenida por maceta era muy pequeña, se optó por unir el material vegetal contenido en las 5 macetas de cada tratamiento. Así se obtuvo una pareja de muestras para cada uno de ellos O1, O2, C1.1, C1.2, C2.1 y C2.2. En estos códigos, el número situado más a la derecha indica el número de réplica. El peso seco sirvió para calcular la producción del cultivo de *B. juncea* (g/m²).

Estas muestras se conservaron en recipientes cerrados hasta su análisis (Figura 4).



Figura 2. Plantas en el suelo control en el momento de la recolección



Figura 3. Plantas en el suelo contaminado en el momento de la recolección



Figura 4: Material vegetal correspondiente a las 5 macetas de cada bandeja tras el secado. Controles, contaminado 1 y contaminado 2 (de arriba abajo).

3.2 Determinaciones analíticas

Las determinaciones se llevaron a cabo en los laboratorios de la EPS, en concreto en los laboratorios del Departamento de Química Analítica y del Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Se determinaron los siguientes parámetros en el suelo: pH en extracto acuoso y en extracto con KCl, conductividad eléctrica (CE) expresada en $\mu\text{S}/\text{Cm}$, materia orgánica (M.O) expresada en g/kg y concentración total y fraccionado de Pb, Cu y Ni expresada en mg/kg (extracciones secuenciales).

En plantas se determinó la concentración de metales y los indicadores de desarrollo vegetal: germinación (%), peso seco por planta (g), altura máxima (mm), cobertura vegetal (%) y producción (g/m^2).

3.2.1 Determinación del pH en extracto acuoso y extracto con KCl

El pH caracteriza el ambiente fisicoquímico del suelo aportando información sobre el estado de degradación, la presencia de determinadas sales, actividad microbiana y el

grado de asimilación de elementos por parte de la planta (Pansu and Gautheyrou, 2006).

Se determina a través de un método electroquímico, para ello se sumerge el electrodo en una solución que mide la diferencia de potencial en función de la concentración de iones H^+ .

Se toman 10 gramos de suelo seco al que se añaden 25 ml de agua destilada y se agita unos 20-30 minutos. Posteriormente se mide el pH utilizando un potenciómetro. Mas tarde con este mismo extracto se realizó la medida de la C.E.

La determinación del pH potencial se realiza de la siguiente manera, se toman 10 gramos de suelo seco al cual se le añaden 25 ml de KCl 1M y se agita durante 30 minutos, a continuación, medimos el pH. Esta medición nos da información sobre la acidez asociada al complejo de intercambio catiónico (C.I.C) ya que tiene en cuenta la acidez total. Ambas determinaciones se realizaron por duplicado.

3.2.2 Determinación de la conductividad eléctrica (CE)

La conductividad eléctrica es una medida proporcional a la cantidad de sales disueltas (aniones y cationes) en soluciones, la cual se basa en la medida de la resistencia eléctrica entre dos electrodos paralelos sumergidos en el extracto acuoso. Se expresa en ($\mu S/cm$) (Pansu and Gautheyrou, 2006).

Para esto se toman las muestras preparadas para determinar el pH y se añaden 25 ml de agua destilada, para obtener una relación suelo:extractante de 1:5, a continuación, se agita durante 1 hora y 30 minutos (puesto que ya ha habido una agitación previa de 30 minutos para la medición del pH), se centrifuga durante 5 minutos a 4000 rpm y finalmente se mide en el sobrenadante.

3.2.3 Determinación de la materia orgánica (MO)

Se determina a partir del contenido de carbono orgánico total siguiendo el método de Walkley and Black (Pansu and Gautheyrou, 2006). El método se basa en la oxidación del carbono orgánico utilizando el $K_2Cr_2O_7$ en medio ácido. Después se realiza una valoración por retroceso del exceso de oxidante con una sal de hierro II ($(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$, sal de Mohr).

Se pesan 0,3 g de suelo seco pulverizado a los que se añaden 10 ml de ácido crómico 0,4N (mezcla de sal de Mohr con H_2SO_4). Se digiere en un tubo de ensayo a $150^\circ C$ durante 10 minutos en un bloque digestor. Pasado el tiempo, los tubos se enfriaron sumergiéndolos en agua fría. A continuación, se trasladó la muestra a matraces con la ayuda de 90 ml de agua destilada en lavados sucesivos. Después se añaden 2 gotas del indicador ferroína y se valora con sal de Mohr 0,2N. Se realizan tres pruebas en un blanco siguiendo el mismo procedimiento, pero sin suelo. (Pansu and Gautheyrou, 2006)

Procedimiento para calcular el carbono orgánico (g/kg):

$$C_{org}(g * kg^{-1}) = \frac{12}{n} \cdot \frac{(B - U)}{R}$$

Siendo:

n= masa de muestra analizada (g)

B= Volumen de sal de Mohr consumido en la prueba de blanco (ml)

U= Volumen de sal de Mohr consumido por la muestra (ml)

Para la estimación de la materia orgánica de la muestra se usa el factor de corrección de Van Bemmelen:

$$MO = Corg * 1,72$$

3.2.4 Caracterización del suelo

En la Tabla 3 se muestran los valores obtenidos de los siguientes parámetros: pH, conductividad eléctrica (CE) y materia orgánica (M.O) para los diferentes tratamientos O, C1 y C2.

Tabla 3. Características químicas del suelo experimental. (media ± desviación)

Tratamiento	pH H ₂ O	pH KCl	C.E(μS/cm)	M.O (g/kg)
O1	7,68 ± 0,007	7,53±0,014	460	44,6±1,730
O2	7,64±0,028	7,5±0,035	800	39,6±6,790
C1.1	7,47±0,000	7,57±0,014	2257	43,6±1,140
C1.2	7,47±0,014	7,57±0,014	3640	42±0,380
C2.1	7,42±0,028	7,45±0,007	905	46,1±4,460
C2.2	7,49±0,007	7,5±0,000	772	43,8±0,004

3.2.5 Determinación de metales en metales en el suelo: Extracciones secuenciales (metodología de Tessier)

Los metales en el suelo están asociados a diferentes compuestos y este método contempla cinco fracciones principales: soluble en agua e intercambiables (F1), unidos a carbonatos (disponibles en ácidos débiles) (F2), asociados a óxidos de Fe-Mn (F3) (reducibles), asociados a materia orgánica (oxidables) y formas residuales (F5) (Frentiu et al., 2008).

Las extracciones secuenciales consisten en la exposición sucesiva de una muestra sólida a soluciones reactivas de diferentes características fisicoquímicas utilizando reactivos con diferentes capacidades extractantes y en unas condiciones determinadas con el fin de determinar el porcentaje de metal que este asociado a cada fracción ("Vista de Extracciones químicas secuenciales de metales pesados. Aplicacion en ciencias geologicas," n.d.). A partir de la suma de las concentraciones de metal (Pb, Cu, Ni) obtenidas en cada fracción, se ha determinado el contenido total de dichos metales en el suelo.

La metodología utilizada ha sido la propuesta por Tessier (1979), la cual consta de 5 etapas (Figura 5). Para ello se tomó 1 gramo de muestra seca y triturada de suelo de cada bandeja por duplicado que se depositó en un tubo con rosca y a partir del cual se realizaron las extracciones secuenciales de la siguiente manera:

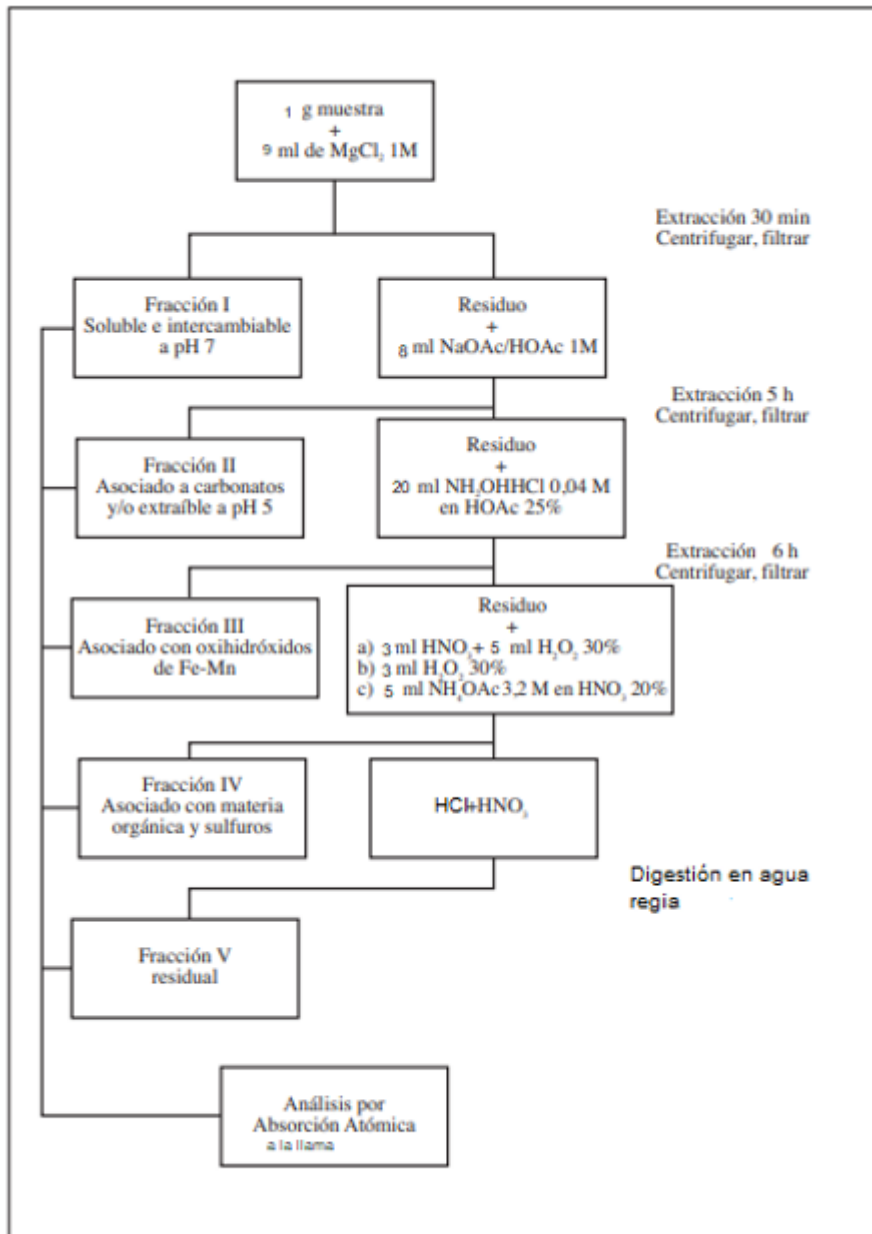


Figura 5. Método extracciones secuenciales de Tessier

1. Fracción I (F1), Intercambiable. Se pesa 1 g de suelo, se añaden 9 ml de MgCl_2 1M (pH 7), se mantiene 1 hora a temperatura ambiente en agitación continua y posteriormente se centrifuga durante 10 minutos. Se extrae el líquido sobrenadante con una pipeta Pasteur, se filtra y se traspara a un matraz aforado de 25 ml. El residuo se lava con agua, se vuelve a centrifugar y se extrae el líquido filtrándolo. Finalmente se enrasa con agua destilada.
2. Fracción II (F2), asociada a carbonatos. Al residuo de la extracción anterior se le añaden 8 ml de NaOAc 1M a pH 5. Se mantiene en continua agitación durante 5 horas a temperatura ambiente y se procede de igual manera que en la anterior extracción recogiendo el extracto en un matraz aforado de 25 ml.

3. Fracción III (F3) asociada a óxidos de Fe-Mn (fracción reducible). Al residuo de la extracción anterior se le añaden 20 ml de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH HCl}$) 0,04 M en acético al 25% y se introduce el tubo en un baño de agua a 96°C manteniéndose estas condiciones durante 6 horas y agitándolos ocasionalmente. Se centrifuga y se procede igual que en las dos fracciones anteriores por último la disolución resultante se lleva a un matraz de 50 ml y se enrasa.
4. Fracción IV (F4) asociada a materia orgánica y sulfuros. Esta extracción consta de 3 etapas: Al residuo de la extracción anterior se le añaden 3 ml de HNO_3 0,02M (pH 2) y 5 ml de H_2O_2 al 30%. Se mantiene en un baño de agua durante 2 horas a 85°C con agitación ocasional. Pasado el tiempo se añaden 3 ml más de H_2O_2 al 30% y se mantiene otras 3 horas con agitación ocasional en el mismo baño. Tras pasar el tiempo se deja enfriar y se añaden 5 ml de NH_4Ac 3,2 M diluido en 20% de HNO_3 . se mantiene en agitación constante durante 30 minutos a temperatura ambiente, se centrifuga y se procede de igual manera que en las extracciones anteriores. La disolución se enrasa en un matraz de 25 ml.
5. Fracción V (F5), residual o mineral. Al residuo de la extracción anterior se le aplica una digestión ácida para solubilizarla. Para esto se utiliza una mezcla de HCl : HNO_3 en proporción 3:1 (agua regia). Al suelo se añaden 4 ml de agua regia se agita y se arrastra a un vaso de teflón. Se cierra herméticamente, se introduce en un horno microondas y se calienta durante 3 minutos a 60W. Se saca y repetimos la misma operación calentando durante 5 minutos. Por último, se filtra la disolución, se recoge en un matraz aforado de 25 ml y se enrasa con agua destilada.

Para la cuantificación de Cu, Pb y Ni en las disoluciones obtenidas se emplea la espectrofotometría de absorción atómica a la llama (EAA). Se preparan 5 disoluciones patrón para cada metal dentro de un rango de concentración determinado de acuerdo con las especificaciones del equipo y considerando su respuesta (absorbancia). Estas disoluciones se preparan a partir de disoluciones patrón de 1000 mg/l en matraces aforados de 100 ml. Para la medición de EAA, para cada metal se selecciona la lámpara de radiación electromagnética (lámpara de cátodo hueco), se ajusta la longitud de onda y se mide la absorbancia de los patrones (calibrado). Por último, se determina la absorbancia de las disoluciones muestra. Las condiciones de medida y los calibrados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de medida y calibrado para cada metal mediante EAA-llama

Metal	λ (nm)	Rango de trabajo (mg/l)	Recta de calibrado	R^2
Cu	324,8	0,5-6	$y=0,0738x+0,0135$	0,9963
Ni	232,0	0,5-6	$y=0,0658x+0,0051$	0,9982
Pb	217,0	2-20	$y=0,0142x+0,0121$	0,9898

3.2.6 Determinación de metales en plantas (*B.juncea*)

Para realizar este análisis se tomó la totalidad del material seco obtenido para cada tratamiento, de tal manera que el rango de pesada osciló entre 0,15 g (contaminado 2) y 2,3 g (control).

Las muestras conservadas se tomaron y trituraron con el mortero. A continuación, se introdujeron en capsulas de porcelana a las que se le aplicó una calcinación (mufla) durante 15 horas a 500°C. El residuo mineral obtenido (cenizas) se traspasó a un vaso de precipitados y se sometió a una digestión acida para descomponerlas y disolverlas. Para ello se utilizó una mezcla de HNO₃:HCl en proporción 1:1. Se añadieron 4 ml de cada reactivo. Se colocaron sobre una placa calefactora y se taparon con un vidrio de reloj (Figura 6) agitando ocasionalmente hasta llevarlas a ebullición. Las muestras no se disolvieron completamente, pero sí en su mayor parte.

Posteriormente, se filtraron y enrasaron con agua destilada en matraces aforados de 50 ml las muestras control (O) que había mayor cantidad de muestra y de 10 ml las muestras contaminadas (C1 y C2).

Para la cuantificación de los metales por EAA, se aplicó el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior.



Figura 6. Residuo mineral tras la calcinación del material vegetal sobre la placa calefactora.

3.2.7 Estimación de la cobertura vegetal mediante análisis de imágenes

Para el cálculo de la cobertura vegetal de cada una de las macetas se utiliza la foto cenital (Figura 7) tomada en día de la recolección. Abrimos la imagen con Photoshop y ajustamos el tono, saturación y luminancia con el fin de conseguir el máximo contraste posible entre el color de las hojas y el fondo.

A continuación, tomamos una referencia de escala de la imagen y con la herramienta varita mágica seleccionamos las porciones de la imagen correspondientes al color de las hojas y tallos. Una vez tenemos seleccionada toda la planta abrimos una tabla con

los datos de las mediciones. Anotamos el dato del área y total y este lo dividimos entre la superficie del suelo, obteniendo la cobertura vegetal.



Figura 7. Foto cenital (control y contaminado)

3.3 análisis de datos

3.3.1 Análisis de varianza (ANOVA)

La técnica de análisis de varianza constituye una herramienta básica para el estudio del efecto de uno o más factores sobre la media de una variable continua (Jorge Dagnino, 2014).

El fundamento del ANOVA se basa en la hipótesis nula de que no hay diferencias entre los niveles de contaminación. Si la hipótesis nula es verdadera, se espera que la variabilidad de cada grupo sea similar a la variabilidad global, considerando los grupos en conjunto. Si la hipótesis nula no es verdadera, la variabilidad global es mayor que la estimada dentro de los grupos. Es decir, las muestras sometidas a un mismo nivel de contaminación son más parecidas entre ellas que con otras muestras sometidas a otros niveles de contaminación.

Por tratarse de un test paramétrico, es siempre preciso comprobar previamente la normalidad de los datos y la homogeneidad de las varianzas.

El programa utilizado para realizar estos ANOVA fue StatView (SAS Institute Inc. 1992-1998, versión 5.0.1).

3.3.2 Análisis de componentes principales (ACP)

El ACP permite la simplificación de un conjunto de datos cuantitativos, procedentes de un conjunto de variables interrelacionadas (Rodríguez and Giménez, 2017). Esto se alcanza a partir de combinaciones lineales de las variables medidas (componentes principales). Los componentes principales se ordenan decrecientemente según la proporción de la varianza que explican, y nos permiten interpretar el máximo de varianza total o la información contenida en las variables.

Gráficamente permite representar en un número mínimo de dimensiones la mayor información posible. Cada eje se corresponde a un componente principal, que a su vez es función de una particular combinación de variables.

El ACP permite representar gráficamente en un plano definido por los dos primeros componentes principales las variables que se han incorporado al análisis, lo que permite explorar su grado de correlación. Por otro lado, permite también representar en el mismo plano los distintos casos de estudio, las muestras analizadas, lo que permite deducir qué parámetros explican fundamentalmente el carácter de cada muestra, y el grado de cercanía o distancia entre las distintas muestras analizadas.

4 RESULTADOS

4.1 Concentración de metales en el suelo

En la Tabla 5 se muestran las concentraciones nominales de Cu, Ni y Pb y su contenido total real (valor experimental). Se observa que hay diferencias entre las concentraciones nominales y las concentraciones reales determinadas como suma del contenido de metales en las 5 fracciones del suelo, probablemente en parte debidas a la propia presencia de estos metales en el suelo (muestras control O1 y O2).

Tabla 5. Concentración nominal de Cu, Ni y Pb y medida en el suelo (promedio \pm desviación estándar, n=2) tras la maduración.

Muestra	Concentración nominal (mg/kg)			Concentración real (mg/kg)		
	Cu	Ni	Pb	Cu	Ni	Pb
O1	0	0	0	13,1 \pm 1,5	26,6 \pm 1,8	4,0 \pm 0
O2	0	0	0	12,4 \pm 1,4	27,3 \pm 0,78	6,8 \pm 0
C1.1	2800	280	2700	2525,2 \pm 103	260,4 \pm 5,3	3135 \pm 58,6
C1.2	2800	280	2700	3367,4 \pm 803,4	325,7 \pm 17,6	3032,5 \pm 136,2
C2.1	5600	560	5400	5815,2 \pm 440,5	539,1 \pm 18,1	5720,4 \pm 8
C2.2	5600	560	5400	5419,0 \pm 7,6	518,0 \pm 10,3	5879,3 \pm 32,5

A continuación, en la Tabla 6, se muestran los resultados obtenidos en las extracciones secuenciales en el suelo para cada metal utilizando el método de Tessier.

Tabla 6. Concentración de metales en las 5 fracciones del suelo consideradas en el método de Tessier (promedio \pm desviación estándar, n=2)

Metal	Muestra	F1	F2	F3	F4	F5
		Intercambiable	Carbonatos	Óxidos Fe-Mn	M.O/ sulfuros	Residual
Cu (mg/kg)	O1	0	0	0	13,1 \pm 1,5	0
	O2	0	0	0	12,4 \pm 1,4	0
	C.1.1	53 \pm 0,094	969,1 \pm 47,4	1207 \pm 57,4	233 \pm 1,6	0,063 \pm 103
	C.1.2	60,3 \pm 2,3	942,1 \pm 25,3	1301 \pm 28,3	244,7 \pm 6,6	819,2 \pm 803,4
	C.2.1	76,2 \pm 4,3	3085 \pm 49,4	1981,6 \pm 117,4	291,8 \pm 0,4	380,6 \pm 440,5
	C.2.2	75,1 \pm 2,7	3088 \pm 91,6	1944,7 \pm 104,6	311,2 \pm 17,9	0
Ni (mg/kg)	O1	2 \pm 2,2	5,8 \pm 0,04	10,8 \pm 0,54	8 \pm 0,24	0
	O2	1,6 \pm 0,05	4,7 \pm 0,03	13,5 \pm 0,8	7,6 \pm 0,025	0
	C.1.1	12,8 \pm 0,09	127,8 \pm 0,12	127,8 \pm 2,5	12 \pm 0,26	8,1 \pm 5,3
	C.1.2	6,5 \pm 1,8	132,8 \pm 3,3	132,8 \pm 3,4	10 \pm 1,3	75,1 \pm 17,6
	C.2.1	7,4 \pm 0,7	236,8 \pm 3,8	236,8 \pm 2	9,5 \pm 0,11	57,3 \pm 18,1

	C.2.2	11,1±0,09	214,3±2,8	214,3±4	8,5±0,35	23,5±10,3
Pb (mg/kg)	O1	0	4±0,12	0	0	0
	O2	0,8±1,1	5,1±1	0,9±4,2	0	0
	C.1.1	252,5±9,1	1667,5±73,4	1028,6±10,6	186,2±13,3	0
	C.1.2	274,8±2,1	1515,4±122,7	1088±0,5	164,4±16,1	0
	C.2.1	532,2±126,7	3202,1±34,4	1697±79,6	289,2±20,8	0
	C.2.2	608,6±11,2	3154±55,1	1789,2±27,9	327,5±39,4	0

En la Figura 8 se muestra gráficamente la distribución por fracciones de metales en el suelo en función del tipo de contaminación. Los valores que se muestran corresponden a la contribución porcentual de cada fracción a la concentración total del metal en el suelo, por lo que las sumas de los valores de F1 a F5 para cada muestra y metal siempre son 100.

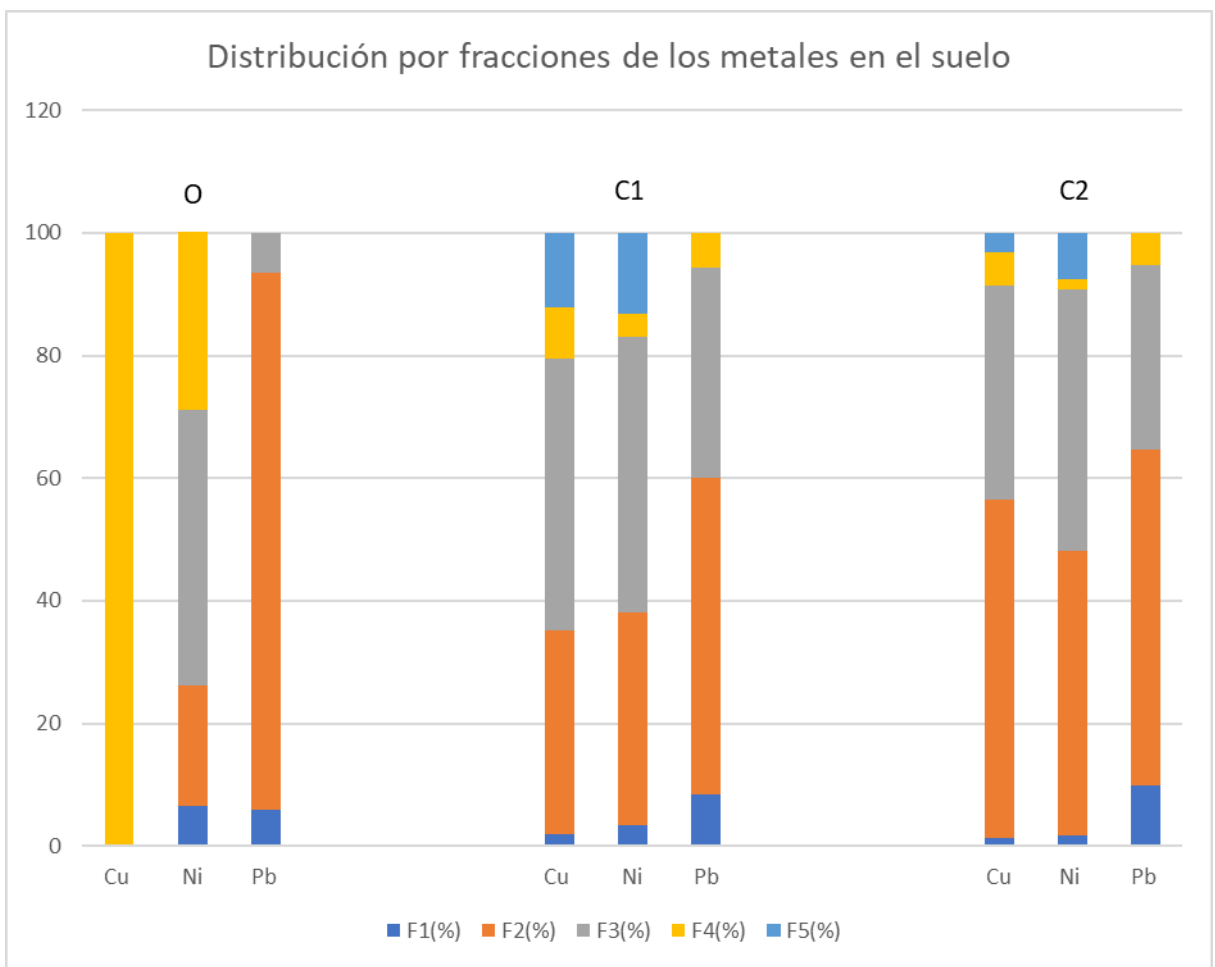


Figura 8. Distribución de metales (%) por fracciones en el suelo en función del tipo de contaminación.

El análisis de varianza realizado para evaluar la existencia de diferencias significativas entre fracciones, para cada metal y nivel de contaminación (Tabla 7), revela una distribución muy desigual de los metales considerados entre las distintas fracciones. Observamos que las fracciones de metales asociados a carbonatos (F2) y a óxidos de Fe-Mn (F3) son las que mayor porcentaje de estos presentan, por lo general entre 60-85%, mientras que las fracciones intercambiable (F1), asociada a M.O (F4) y mineral (F5) tan solo representan alrededor de un 15% de los metales en el suelo en la mayoría de los casos.

Cabe destacar que el Cu en el suelo control se encuentra en su totalidad asociado a la materia orgánica y a sulfuros, mientras que en los suelos contaminados artificialmente se encuentra mayoritariamente en las fracciones 2 y 3, asociadas a carbonatos y a óxidos, respectivamente, mientras que la fracción asociada a la materia orgánica no alcanza a representar ni tan solo un 10% de la concentración total.

En menor medida, esta distribución desigual de los metales entre fracciones, al comparar el suelo control con las muestras contaminadas, se aprecia también en el caso del Ni. Si bien para este metal la fracción mayoritaria en todas las muestras es la asociada a los óxidos (F3), con valores superiores al 40%, en el suelo control la segunda fracción mayoritaria vuelve a ser la F4, asociada a la materia orgánica (28,92±1,79 %), mientras que en las muestras contaminadas la segunda fracción mayoritaria es la asociada a carbonatos, con valores entre el 35 y el 46%.

En el caso del Pb, éste se encuentra en todas las muestras mayoritariamente en la fracción asociada a carbonatos, aunque en el suelo control esta fracción representa casi el 90% del total, y en las muestras contaminadas solamente poco más del 50%, siendo la fracción F3, asociada a óxidos, la segunda fracción con mayor abundancia (30-35%).

En las muestras contaminadas, si comparamos la distribución de los tres metales en las distintas fracciones, podemos decir que, aunque se aprecian ciertas diferencias cuantitativas entre niveles de contaminación alto o bajo (C1 y C2), las distribuciones siguen generalmente el mismo patrón, por lo que la concentración total del metal en muestras contaminadas no parece que afecte a su distribución en el suelo.

Tabla 7. Resultados del análisis de varianza de la distribución por fracciones de los metales considerados en este trabajo, en función del nivel de contaminación del suelo. Se adjunta para cada análisis el valor de p correspondiente. Para un mismo metal y nivel de contaminación, letras distintas indican la existencia de diferencias significativas entre fracciones

Tratamiento	Cu					P
	F1(%)	F2(%)	F3(%)	F4(%)	F5(%)	
O	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	100±0,00 b	0,00±0,00 a	<0.0001
C1	1,95 ±0,22 a	33,18 ±7,35 bc	44,46 ±8,24 c	8,25 ±1,39 a	12,17 ±17,20 ab	0.0228
C2	1,38 ±0,53 a	55,02 ±2,78 c	34,98 ±1,28 b	5,38 ±0,51 a	3,27 ±4,63 a	<0.0001
	Ni					
O	6,58 ±1,07 a	19,47 ±3,30 b	45,03 ± 6,15 d	28,92 ±1,79 c	0,00±0,00 a	0.0002
C1	3,47 ±2,07 a	34,67 ±5,09 b	44,93 ±5,87 b	3,84 ±1,09 a	13,10 ±14,11 a	0.0070
C2	1,76 ±0,54 a	46,29 ±5,63 b	42,67 ±1,79 b	1,71 ±0,08 a	7,58 ±4,31 a	<0.0001
	Pb					
O	5,84 ±8,25 a	87,67 ±17,44 b	6,50 ±9,19 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0.0010
C1	8,39 ±0,48 b	51,58 ±2,28 d	34,34 ±2,17 c	5,68 ±0,37 b	0,00±0,00 a	<0.0001
C2	9,83 ±0,74 c	54,81 ±1,65 e	30,05 ±0,54 d	5,31 ±0,36 b	0,00±0,00 a	<0.0001

4.2 Concentración de metales en *B.juncea*

En la Tabla 8 se muestran las concentraciones de cada metal en el material vegetal, que en este caso era una mezcla de los tallos y hojas recolectadas por encima de la superficie del suelo, sin raíces.

Tabla 8. Concentraciones de Cu, Ni y Pb en los tejidos vegetales aéreos (tallos y hojas) (media \pm sd, n=2)

Tratamiento	Cu (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Pb (mg/kg)
O	12,3 \pm 1,7	13,7 \pm 1,5	19,1 \pm 0,4
C1	1116,2 \pm 741,8	177,3 \pm 105,7	1084,9 \pm 724,2
C2	1468,4 \pm 502	228,5 \pm 61,2	1844,7 \pm 513,2

El análisis de varianza de las concentraciones de los tres metales en planta respecto al nivel de contaminación del suelo (Tabla 9) no ha permitido hallar diferencias significativas entre tratamientos, aunque cabe destacar que, debido a la gran variabilidad entre muestras, la potencia de los análisis en este caso ha sido muy baja (0.337, 0.383 y 0.460 para Cu, Ni y Pb, respectivamente).

Tabla 9. Relación entre el tipo de contaminación y la concentración de metales en plantas (media \pm sd). Se incluye, para cada análisis, el valor de p obtenido en el análisis de varianza.

Tratamiento	Cu (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Pb (mg/kg)
O	12.3 \pm 1.7 a	13,7 \pm 1.5 a	19,1 \pm 0,4 a
C1	1116,2 \pm 741.8 a	177,3 \pm 105,7 a	1085.0 \pm 724,2 a
C2	1468,4 \pm 501,9 a	228,6 \pm 61,3 a	1844,7 \pm 513.2 a
p	0.1310	0.1093	0.0827

No obstante, nuestros datos muestran que las concentraciones de los tres metales en los tejidos vegetales tienden claramente a aumentar en las plantas que se han desarrollado en las muestras más contaminadas, por lo que esta tendencia se ha evaluado mediante análisis de regresión lineal, tomando como variables independientes la concentración total (suma de F1 a F5) o asimilable (fracción F1) de cada metal en el suelo, y como variable dependiente la concentración del mismo metal en los tejidos vegetales (Tabla 10). Estos análisis reflejan que por lo general (a excepción del Pb), la concentración total del metal en el suelo no explica las diferencias de concentración en los tejidos vegetales, pero que, sin embargo, las concentraciones consideradas asimilables (fracción F1) sí explican las diferencias en la concentración de los metales en la planta, con valores de R² que varían entre 0.687 para el Cu y 0.941 para el Ni.

Tabla 10. Resultados de los análisis de regresión lineal entre las concentraciones totales y asimilables (fracción F1) de los metales en el suelo y las concentraciones en los tejidos vegetales.

Variable dependiente	Variable independiente	R ²	P
Cu planta	Cu total	0,589	0,0746
	Cu intercambiable	0,687	0,0414
Ni planta	Ni total	0,641	0,0558
	Ni intercambiable	0,941	0,0013
Pb planta	Pb total	0,824	0,0124
	Pb intercambiable	0,818	0,0133

4.3 Efecto de la contaminación por Cu, Ni y Pb en el desarrollo de *Brassica juncea*

Los análisis de varianza revelan que la germinación de las semillas de *B. juncea* no se ve afectada por el nivel de contaminación del suelo (Tabla 11). Sin embargo, el nivel de contaminación sí que presenta efectos significativos en el resto de los indicadores del desarrollo vegetal, reduciendo respecto al control el peso seco por planta en un promedio del 91%, la altura de la planta en un 86%, la cobertura vegetal del suelo en un 96% y la producción vegetal en un 86%, sin que en ningún caso se detecten diferencias significativas en estos parámetros en función de la carga contaminante.

Tabla 11. Resultados de los análisis de varianza del nivel de contaminación del suelo sobre los indicadores de desarrollo vegetal: germinación, peso por planta, altura máxima promedio, cobertura y producción vegetal. Se incluyen en la tabla los valores de p obtenidos en los respectivos análisis.

Tratamiento	Germinación (%)	Peso seco por planta (g)	Altura (cm)	Cobertura vegetal (%)	Producción vegetal (g/m ²)
O	9,8 ± 3,1 a	0,103 ± 0,035 a	15,1 ± 1,3 a	56,9 ± 13,1 a	35,9 ± 0,7 a
C1	10,2 ± 7,6 a	0,011 ± 0,003 b	2,0 ± 0,6 b	2,2 ± 0,4 b	3,9 ± 2,1 b
C2	22,6 ± 1,4 a	0,007 ± 0,0003 b	2,2 ± 0,3 b	2,2 ± 0,3 b	5,9 ± 0,6 b
P	0,1238	0,0283	0,0009	0,0084	0,0003

4.4 Factores de concentración (FC) y extracción de metales en el suelo

El factor de concentración (FC, Tabla 12) se ha calculado dividiendo la concentración de metal en la planta por la concentración de metal en el suelo, por lo que un valor superior a 1 significa que la concentración en planta es mayor que en el suelo.

Tabla 12. Resultados del análisis de varianza del Factor de Concentración (FC) para Cu, Ni y Pb en función del nivel de contaminación del suelo.

Tipo de contaminación	Metal		
	Cu	Ni	Pb
O	0,971 ± 0,169 a	0,507 ± 0,047 a	3,840 ± 1,493 a
C1	0,413 ± 0,335 a	0,641 ± 0,462 a	0,349 ± 0,227 b
C2	0,264 ± 0,103 a	0,434 ± 0,128 a	0,317 ± 0,082 b
P	0,0992	0,7700	0,0429

En el caso del Cu, aunque de forma solo marginalmente significativa ($p=0.0992$), al aumentar el nivel de contaminación disminuye el FC. Sin embargo, los FC muestran patrones distintos para el Ni, donde los valores son virtualmente iguales e independientes del nivel de concentración ($p=0.7700$) y para el Pb, donde las plantas del suelo control muestran un FC un orden de magnitud mayor que el de las plantas desarrolladas sobre los suelos contaminados, donde los valores son siempre muy bajos e independientes del nivel de contaminación (Figura 9).

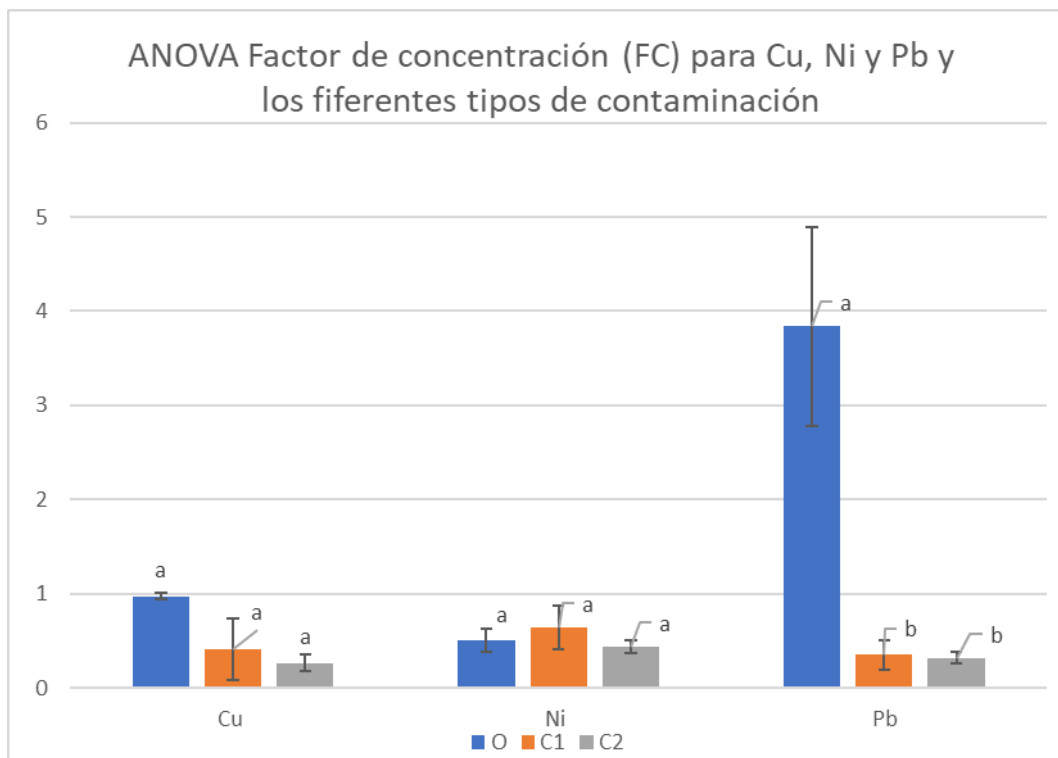


Figura 9. Factor de concentración (FC) para Cu, Ni y Pb teniendo en cuenta los diferentes tipos de contaminación (ANOVA).

Para todos los metales estudiados, los análisis de varianza (Tabla 13) revelan que la extracción por parte de la planta es significativamente mayor en las muestras más contaminadas. Sin embargo, en todos los casos la reducción en la concentración de los metales en el suelo se sitúa por debajo de 1 mg kg^{-1} , lo que representa por lo general una extracción inferior al 5% de las cantidades presentes en la fracción considerada biodisponible (F1).

Tabla 13. Análisis de varianza de la extracción vegetal de Cu, Ni y Pb en función del tipo de contaminación.

Tipo de contaminación	Extracción vegetal (mg/kg)		
	Cu	Ni	Pb
O	$0,034 \pm 0,005$ a	$0,038 \pm 0,005$ a	$0,053 \pm 0,001$ a
C1	$0,279 \pm 0,045$ a	$0,045 \pm 0,003$ a	$0,271 \pm 0,044$ a
C2	$0,650 \pm 0,156$ b	$0,102 \pm 0,017$ b	$0,819 \pm 0,143$ b
P	0,0162	0,0148	0,0064

4.5 Análisis de componentes principales (ACP)

Con el objetivo de sintetizar la información contenida en los resultados obtenidos de las muestras analizadas, se ha llevado a cabo un análisis de componentes principales que nos permite establecer relaciones entre las diferentes variables estudiadas, así como establecer diferencias entre los tratamientos aplicados. Para su realización se han incluido las siguientes variables: concentraciones totales de metales en el suelo, concentraciones en la F1, concentraciones de metales en plantas, FC, pH y los indicadores de desarrollo vegetal (producción, germinación, altura, peso seco y cobertura vegetal). Se han excluido del análisis los resultados de M.O. y C.E. debido a que en un análisis previo se ha constatado que explican muy poca varianza.

El componente principal 1 explica poco más de un 79% de la varianza total y se correlaciona positivamente con las concentraciones totales de metales en el suelo y la concentración de cobre en la fracción intercambiable, y negativamente con el pH, los factores de concentración (FC) de Cu y Pb, y los indicadores de desarrollo vegetal a excepción de la germinación (tabla 12).

Por su parte, el componente principal 2 explica un 14% adicional de la varianza total. La variable más correlacionada con la segunda componente de manera positiva es el factor de concentración del níquel (FCNi) y de manera negativa la germinación (Tabla 14).

Tabla 14. Coeficientes de correlación de las variables incluidas en el análisis de componentes principales con los componentes 1 y 2.

	Componente	
	1	2
pH	-0,952	0,011
Cu suelo	0,952	-0,271
Ni suelo	0,958	-0,250
Pb suelo	0,969	-0,153
Cu F1	0,993	-0,106
Ni F1	0,857	0,500
Pb F1	0,941	-0,194
Producción	-0,956	-0,146
Germinación	0,591	-0,748
Altura	-0,964	-0,129
Peso seco	-0,929	0,016
C Vegetal	-0,951	-0,103
Cu planta	0,891	0,382
Ni planta	0,905	0,365
Pb planta	0,910	0,234
Cu FC	-0,860	0,410
Ni FC	0,023	0,990
Pb FC	-0,909	-0,062

La Figura 10 muestra la proyección de las variables estudiadas sobre el plano determinado por los componentes principales 1 y 2, en la que se observa que el componente 1 se relaciona directamente con el nivel de contaminación (hacia la derecha del gráfico) negativamente inversamente (hacia la izquierda del gráfico) con el desarrollo de las plantas.

Por otro lado, el componente 2 se correlaciona positivamente (hacia arriba) con el FCNi y negativamente (hacia abajo) con la germinación, por lo que estas dos variables parecen relativamente independientes del nivel de contaminación del suelo (componente 1).

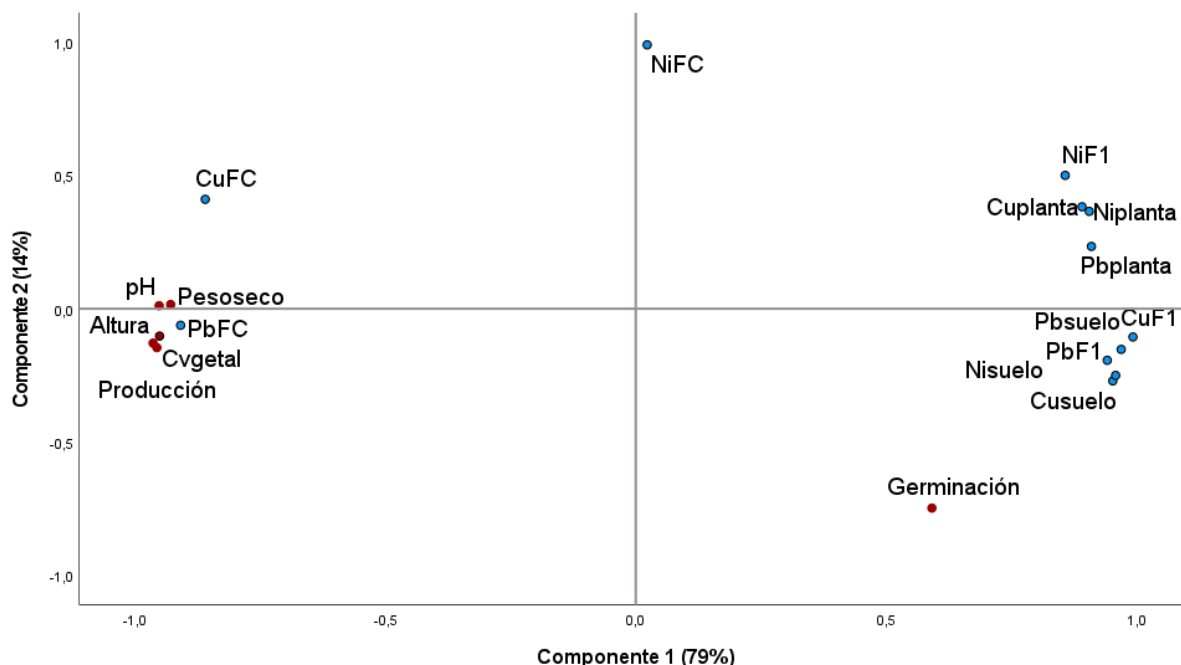


Figura 10. Proyección de las variables estudiadas sobre el plano definido por los componentes principales 1 (79% de la varianza) y 2 (14% de la varianza).

La proyección de las muestras estudiadas sobre el plano definido por los dos primeros componentes principales (Figura 11) muestra que se ordenan de izquierda a derecha en función de su nivel de contaminación y de su desarrollo vegetal. Asimismo, se observa también que en relación al componente principal 1 las muestras contaminadas se encuentran más cercanas entre sí que con las muestras control, lo que demuestra que las muestras contaminadas son más similares entre ellas. Las muestras contaminadas se encuentran a la derecha del gráfico formando un núcleo, mientras que las muestras de control se encuentran a la izquierda, debido a sus bajas concentraciones de metales y a su mayor desarrollo vegetal.

El componente 2 es el que marca la diferencia entre cada pareja de muestras, siendo las muestras control las más parecidas entre ellas (O) y las ligeramente contaminadas (C1) las más dispares. La posición de las muestras con respecto a la componente 2 (más arriba o más abajo) en el gráfico depende esencialmente de la germinación de las semillas y del FCNi ya que son características que poco tienen que ver con el nivel de contaminación.

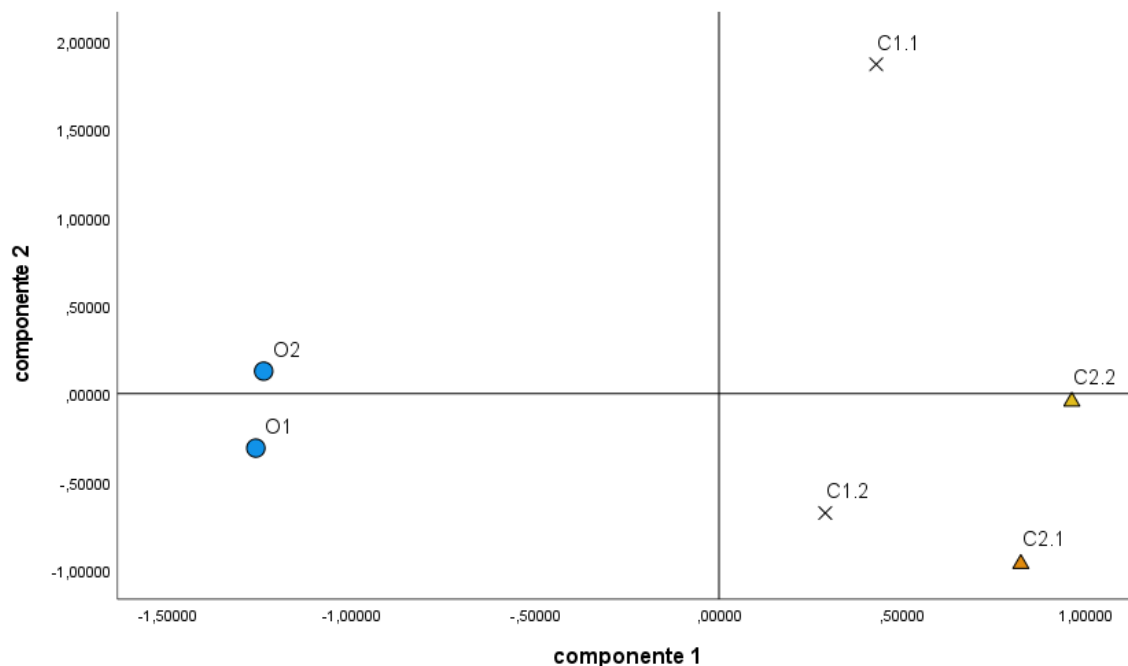


Figura 11. Proyección de las muestras estudiadas sobre el plano definido por los componentes principales 1 (79% de la varianza) y 2 (14% de la varianza).

5 DISCUSIÓN

5.1 Distribución de los metales en el suelo

Los metales pesados en el suelo se distribuyen entre los componentes de la fase sólida de diferente manera en función de las características del suelo (pH, M.O, presencia y tamaño de partícula de carbonatos, abundancia y tipos de óxidos metálicos, etc.), la naturaleza de la contaminación y las condiciones ambientales (Hernández Zamora, 2009).

En suelos contaminados Cu, Ni y Pb están asociados principalmente a materia orgánica (F4) y a óxidos (F3). En el caso del plomo, la M.O retiene el metal de una forma más estable en el suelo (Bose et al., 2008), mientras que, la movilidad del Ni y Pb depende en gran medida de su asociación a carbonatos (F2), lo que facilitara la fitoextracción, ya que en el suelo objeto de estudio, los metales están asociados en su mayoría a F2 y F3 (Páez et al., 2016). Sin embargo, el Ni y el Cu aparecen fundamentalmente en la F4 en el suelo control. Esta distribución de los metales en el suelo está ligada al nivel de contaminación y tiempo de maduración. Ya que lo ideal en suelos contaminados por metales es que se asocien a la F4 y F5 para que presente menos problemas de disponibilidad y estabilidad a largo plazo.

Así pues, en otro estudio realizado con anterioridad en un suelo contaminado artificialmente con los mismos metales y niveles de contaminación (C1 y C2) los metales se encontraban distribuidos principalmente en la F2. Esto se debe a que el envejecimiento del suelo no fue suficiente para que se distribuyan por la matriz del suelo, o bien a cambios en las características de la matriz mineral del suelo, o a su contenido en materia orgánica. No se encontraron diferencias en la distribución de

metales al comparar los distintos tratamientos, pudiendo afirmar que la concentración de metal no afecta a su distribución en la matriz del suelo (Vaquero,2019).

La biodisponibilidad de un elemento se refiere a las formas que pueden llegar a ser absorbidas por un organismo e integrarse en su metabolismo. Esto va a depender fundamentalmente de las formas o especiación en las que se encuentren los metales en el suelo y de la capacidad de absorción del propio organismo (Sanz, 2015). Por lo tanto, la biodisponibilidad de los metales en el suelo es un factor que afecta a la eficiencia de extracción. Generalmente solo una fracción (intercambiable) del metal del suelo está disponible para ser absorbido por las plantas (Ali et al., 2013).

La fracción intercambiable (F1) es la que los metales suelen estar disponibles. En un estudio de un suelo contaminado artificialmente con 1000 mg/kg de Pb, tan solo alrededor de un 10% se encontraba en la fracción intercambiable (Tai et al., 2013).

En otro trabajo consultado el en la F1 se encontraba el 10% del total de la concentración de Ni y Pb mientras que no se encontró nada de Cu asociado a esa fracción (Vaquero 2019). Esta concentración es muy similar a la que encontramos en nuestro trabajo, además el Cu es el metal que en menor medida este asociado a esta fracción.

Los metales intercambiables correspondientes a la F1 son los que presentan mayor biodisponibilidad seguidos por los metales asociados a la materia orgánica (F4) aunque depende de su grado de descomposición y oxidación (Sheoran et al., 2016).

Respecto a la biodisponibilidad de los metales se distinguen: fácilmente biodisponible (Ni y Cu) y poco biodisponible (Pb) (Sanz, 2015).

El Ni y Cu son considerados esenciales para el desarrollo de la planta a diferencia del Pb. El Cu es importante en la fotosíntesis, metabolismo de proteínas y carbohidratos y en la fijación de nitrógeno. Por otra parte el Ni es beneficioso para el crecimiento de algunas especies e imparte resistencia a enfermedades (Singh et al., 2016).

Ciertas especies de plantas han desarrollado mecanismos para solubilizar elementos poco biodisponibles. Las raíces secretan sustancias movilizadoras de metales en la rizosfera (fitosideróforos). Sin embargo, estos mecanismos pueden facilitar la absorción de otros metales tóxicos no esenciales como el Pb (Sanz, 2015).

5.2 Extracción de metales por parte de B.juncea

B. juncea es una especie que acumula gran parte de metales en la parte aérea. Se puede observar tanto en nuestro estudio como en otros consultados que la concentración en ésta aumenta junto a la concentración en el suelo, aunque no lo hace linealmente ya que al llegar a un nivel de contaminación muy elevado la concentración en la planta disminuye.

En el caso particular del plomo esto ocurre a partir de 6100 mg/kg (Begonia et al., 1998), lo que permite afirmar que en nuestro estudio no tenemos una absorción máxima de plomo. Para que una planta sea hiperacumuladora debe, además de concentrar al menos 1000 mg/kg (Pb), resistir el efecto tóxico (Sheoran et al., 2016), lo que, como se deduce de la escasa producción de biomasa, no parece cumplirse en

nuestro trabajo. Con nuestros resultados, pues, no podemos calificar a *B. juncea* de planta hiperacumuladora.

La concentración normal de Cu en *B. juncea* es 5-25 mg/kg, siendo raras las concentraciones por encima de 100 mg/kg aún en presencia de un alto contenido de éste en el suelo. En suelos contaminados, se han llegado a detectar hasta 3771 mg/kg (Ariyakanon and Winaipanich, 2006), por lo que en nuestro caso estaríamos en un rango de concentraciones relativamente normal, dado el estado de contaminación de los suelos para este metal.

El factor de concentración (FC) se relaciona con la capacidad de una planta para acumular metales del suelo. Si los valores de esta son mayores que 1 se considera fitoextractora si son menores a 1 fitoestabilizadora (Hernández Zamora, 2009). Los valores obtenidos en el presente estudio no han sido superiores a 1 lo que indica que la acumulación de metales en *B. juncea* es muy pequeña en comparación con la concentración inicial en el suelo.

Se observó que para unas concentraciones de 50 – 200 mg/kg de Cu en el suelo el FC es respectivamente de 21,2 y 10,9 por lo que el FC disminuye al aumentar mucho la contaminación (Ariyakanon and Winaipanich, 2006). Este FC tan elevado podría deberse a la baja concentración de metal en el suelo en las condiciones descritas por los autores. En este sentido, cabe destacar que según Mapanda, Mangwayana y Nyamangara (2007) el FC de Cu, Ni y Pb es menor cuanto mayor es la concentración en el suelo siendo el FC de Cu de 0,175 con una concentración de 20 mg/kg en el suelo y de 0,034 con una concentración de 61mg/kg. El Ni presenta un FC del 0,49 con una concentración de 11 mg/kg. Finalmente el Pb presenta un FC de 0,35 con una concentración de 11 mg/kg y 0,1 con una concentración máxima de 29mg/kg (Khalid et al., 2017).

Estos valores son inferiores a los que encontramos nosotros para el tratamiento de contaminación C2. Se observa que para una concentración de Ni de 200 mg/kg el FC es del 32% muy por debajo del que presenta nuestro suelo para el tratamiento C1 siendo del 65% (Do Nascimento et al., 2006).

Por otro lado, un estudio realizado en Jales (México) observó que para una concentración en el suelo de Pb que aumentaba desde 1200 a 7100 el FC se redujo de 0,62 a 0,24 (Hernández Zamora, 2009).

5.3 Eficacia del proceso de extracción

Existen diversas características necesarias en una especie vegetal para que la fitoextracción sea eficaz: crecimiento rápido y alta biomasa, sistema de raíces extendido, buena tolerancia a altas concentraciones de metales en sus tejidos, alto factor de translocación, buena adaptación a las condiciones ambientales, resistencia a patógenos, plagas y fácil cultivo (Sheoran et al., 2016).

El potencial de fitoextracción de una especie vegetal se determina principalmente por dos factores principales la concentración de metales en los brotes y la biomasa de los brotes aérea (Ali et al., 2013).

Hay una relación inversa entre el área foliar total y la concentración de Pb. En comparación con el control el área foliar se redujo en un 25% y un 47%

respectivamente en las plantas tratadas con 250 y 500 mg/kg. Además, las plantas exhibían una coloración violácea que se volvió más severa hacia el momento de la cosecha. El crecimiento de los brotes no fue inhibido (Begonia et al., 1998).

B. juncea presenta clorosis en tallo y hojas además de un crecimiento reducido en plantas tratadas con 200 mg/kg de Cu . el exceso de Cu produce alteraciones en las raíces que adquieren una tonalidad oscura (Turan and Esringü, 2007).

Aunque muchos trabajos demuestran la que *B. juncea* es una planta eficaz para la fitorremediación ya que absorbe una elevada cantidad de metales en nuestro caso no ha sido así. Esta planta se desarrolla fácilmente y sin problemas a concentraciones bajas de metales, pero presenta efectos adversos en su desarrollo si la concentración de metales en el suelo es muy elevada.

La fitotoxicidad se asocia con la acumulación de sustancias dañinas en el tejido de las plantas a niveles que afectan el crecimiento y desarrollo normal. En nuestras plantas hay síntomas visuales muy aparentes y confirmados por los datos de producción de fitotoxicidad por metales en los brotes *B. juncea* durante la germinación y el crecimiento. Se observa una reducción de la biomasa, así como clorosis y necrosis en las hojas de las plantas. Tanto las plantas del tratamiento C1 como las del C2 presentaban los mismos síntomas fitotóxicos no habiendo diferencias apreciables entre ambos tratamientos. Ello sugiere que, a pesar de que las cantidades de metales que la planta ha asimilado no son negligibles, la escasa producción vegetal hace que, en los rangos de concentraciones de metales estudiados, no sea una planta apta para trabajos de fitoextracción.

5.4 Conclusiones

- Los niveles de contaminación elevados tienen un efecto negativo en el desarrollo de *Brassica juncea*. En nuestro trabajo, estos efectos se han observado en concentraciones de Cu de 2525 mg/kg, de Ni de 260 mg/kg y de Pb de 3032 mg/kg, aunque no se puede afirmar si se trata del efecto de uno de estos metales en particular o bien de un efecto sinérgico entre ellos.
- En los suelos contaminados artificialmente, Cu, Ni y Pb se encuentran mayoritariamente asociados a carbonatos (F2) y a óxidos de Fe-Mn (F3). La proporción de estos tres metales en la fracción considerada biodisponible (F1) ha sido siempre inferior al 10% de la concentración total. Ello implica una baja biodisponibilidad de estos metales en el suelo estudiado.
- La asimilación de Cu, Ni y Pb en *Brassica juncea* es directamente proporcional a las concentraciones de estos tres metales en la fracción considerada biodisponible (F1), pero no a las concentraciones totales.
- La presencia de Cu, Ni y Pb en las concentraciones ensayadas en el suelo inhibe significativamente la producción de *Brassica juncea*, en términos de peso seco por planta, altura, cobertura vegetal y producción por unidad de superficie.
- Los factores de concentración de los tres metales han sido siempre inferiores a 1 en los suelos contaminados, superándose únicamente este umbral en el caso del Pb en el suelo control.
- La escasa producción vegetal en los suelos contaminados es la razón principal que limita la eficacia de la fitoextracción mediante el uso de *Brassica juncea* en un

suelo calizo y en las concentraciones ensayadas no es una práctica viable de fitoextracción.

6 REFERENCIAS

- Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A., 2013. Phytoremediation of heavy metals- Concepts and applications *Chemosphere* 91, 869–881. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.075.
- Ariyakanon, N., Winaipanich, B., 2006. Phytoremediation of Copper Contaminated Soil by *Brassica juncea* (L.) Czern and *Bidens alba* (L.) DC. var. *radiata*. *Journal of Scientific Research, Chulalongkorn University* 31, 49–56.
- Begonia, G.B., Davis, C.D., Begonia, M.F.T., Gray, C.N., 1998. Growth responses of Indian mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern.] and its phytoextraction of lead from a contaminated soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 61, 38–43. doi:10.1007/s001289900726.
- Bluskov, S., Arocena, J.M., Omotoso, O.O., Young, J.P., 2005. Uptake, distribution, and speciation of chromium in *Brassica Juncea*. *International Journal of Phytoremediation* 7, 153–165. doi:10.1080/16226510590950441.
- Bose, S., Jain, A., Rai, V., Ramanathan, A.L., 2008. Chemical fractionation and translocation of heavy metals in *Canna indica* L. grown on industrial waste amended soil. *Journal of Hazardous Materials* 160, 187–193. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.02.119.
- Do Nascimento, C.W.A., Amarasiriwardena, D., Xing, B., 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. doi:10.1016/J.ENVPOL.2005.06.017.
- Frentiu, T., Ponta, M., Levei, E., Gheorghiu, E., Kasler, I., Cordos, E.A., 2008. Validation of the Tessier scheme for speciation of metals in soil using the Bland and Altman test. *Chemical Papers* 62, 114–122. doi:10.2478/s11696-007-0087-3.
- Galán Huertos, E., Romero Baena, A., 2008. Contaminación de Suelos por Metales Pesados. *Macla* 10, 48–60.
- García, C., Moreno, J., Hernández, M., Polo, A., 2002. Metales pesados y sus implicaciones en la calidad del suelo. *Ciencia y Medio Ambiente- CCMA-CSIC* 125–138.
- Hernández Zamora, M.A., 2009. Estudio de la acumulación de plomo y cadmio por *Asphodelus fistulosus* L. y *Brassica Juncea* para fitorremediar jales.
- Ibarra, P., 2004. La diversidad edáfica del territorio aragonés. *La Diversidad*

Edáfica Del Territorio Aragonés 41–53.

- IGME, n.d. Determinación de niveles de fondo y niveles genéricos de referencia para metales en suelos de la Comunidad Autónoma de Aragón.
- Introducción a la contaminación de suelo-JIMÉNEZ BALLESTA, RAIMUNDO-Google Libros.
- Jorge Dagnino, S., 2014. Análisis de varianza. Revista Chilena de Anestesia 43, 306–310. doi:10.2307/j.ctvvn8k0.7.
- Kabata-Pendias, A., 2004. Soil-plant transfer of trace elements - An environmental issue. Geoderma 122, 143–149. doi:10.1016/j.geoderma.2004.01.004.
- Khalid, S., Shahid, M., Niazi, N.K., Murtaza, B., Bibi, I., Dumat, C., 2017. A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. Journal of Geochemical Exploration 182, 247–268. doi:10.1016/j.gexplo.2016.11.021.
- Mahar, A., Wang, P., Ali, A., Awasthi, M.K., Lahori, A.H., Wang, Q., Li, R., Zhang, Z., 2016. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. Ecotoxicology and Environmental Safety 126, 111–121. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.12.023.
- Materia, P., n.d. Práctica 7. Materia orgánica 4–5.
- Páez, L.E.C., Del Socorro Bravo Realpe, I., Peinado, F.J.M., Flores, J.C.M., 2016. Extracción secuencial de metales pesados en dos suelos conta-Minados (andisol y vertisol) enmendados con ácidos húmicos. Acta Agronomica 65, 232–238. doi:10.15446/acag.v65n3.44485.
- Pansu, M., Gautheyrou, J., 2006. Handbook of soil analysis: Mineralogical, organic and inorganic methods, Handbook of Soil Analysis: Mineralogical, Organic and Inorganic Methods. doi:10.1007/978-3-540-31211-6.
- Rodríguez, J., Giménez, E., 2017. Aplicación del análisis de componentes principales en la investigación de aguas de pozo para el consumo humano. Población y Desarrollo 23, 38–52. doi:10.18004/pdfce/2076-054x/2017.023(45).038-052.
- Sanz, S.B., 2015. Aplicación de la Fitorremediación.
- Sheoran, V., Sheoran, A.S., Poonia, P., 2016. Factors Affecting Phytoextraction: A Review. Pedosphere 26, 148–166. doi:10.1016/S1002-0160(15)60032-7

- Singh, U., Praharaj, C.S., Singh, S.S., Singh, N.P., 2016. Biofortification of food crops. *Biofortification of Food Crops* 1–490. doi:10.1007/978-81-322-2716-8.
- Tai, Y., McBride, M.B., Li, Z., 2013. Evaluating specificity of sequential extraction for chemical forms of lead in artificially-contaminated and field-contaminated soils. *Talanta* 107, 183–188. doi:10.1016/j.talanta.2013.01.008.
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M., 1979. Sequential Extraction Procedure for the Speciation of Particulate Trace Metals. *Analytical Chemistry* 51, 844–851. doi:10.1021/ac50043a017.
- Turan, M., Esringü, A., 2007. Phytoremediation based on canola (*Brassica napus* L.) and Indian mustard (*Brassica juncea* L.) planted on spiked soil by aliquot amount of Cd, Cu, Pb, and Zn. *Plant, Soil and Environment* 53, 7–15. doi:10.17221/3188-pse.
- unknown, n.d. 4. Metales pesados en suelos.
- Vaquero (2019). Estudio de las posibilidades de utilización de *Brassica juncea* para la fitorremediación de suelos contaminados por metales pesados en Aragón. (Trabajo de Fin de Grado). Universidad de Zaragoza.
- Vista de Extracciones químicas secuenciales de metales pesados. Aplicación en ciencias. <https://estudiosgeol.revistas.csic.es/index.php/estudios/article/view/118/114>(accessed 6.24.21).