

**Acumulación de metales (cadmio, zinc, cobre, cromo, níquel y plomo) en especies del género *Pelargonium*: suministro desde el suelo, ubicación en la planta y toxicidad**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,  
Área Ciencias Agropecuarias*

**Daniela Inés Orroño**

Ingeniera Agrónoma - Universidad de Buenos Aires -2002

Lugar de trabajo: Cátedra de Fertilidad y Fertilizantes, FAUBA



**FAUBA**

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano  
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



## COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

**Raúl Silvio Lavado**

Ing. agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Diplomado en Edafología y Biología Vegetal (Universidad de Granada, España)

Consejero de Estudios

**Mónica Rodríguez**

Ing. agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Magister Scientiae y Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

## JURADO DE TESIS

Director de tesis

**Raúl Silvio Lavado**

Ing. agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Diplomado en Edafología y Biología Vegetal (Universidad de Granada, España)

JURADO

**Alicia Fernández Cirelli**

Lic. en Ciencias Químicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Químicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

**María Patricia Benavides**

Lic. en Bioquímica (Universidad Nacional de San Luis)

Doctora en Ciencias Bioquímicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

**María Alejandra Maine**

Lic. en Química (Universidad Nacional del Litoral)

Doctora en Química (Universidad Nacional del Litoral)

Fecha de defensa de la tesis: 5 de mayo de 2011

**DECLARACIÓN**

*“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución”.*

**PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS**

Orroño, D.; H. Benítez and R.S. Lavado. 2009. Effect of heavy metals in soils on biomass production and plant element accumulation of *Pelargonium* and *Chrysanthemum* species. *Agrochimica* 53:168-176.

Orroño, D. & R.S. Lavado. 2009. Distribution of extractable Heavy Metals in different Soil Fractions. *Chemical Speciation and Bioavailability* 21:193-198.

Orroño, D. & R.S. Lavado. 2009. Heavy metal accumulation in *Pelargonium hortorum*: Effects on growth and development. *PHYTON* 78: 75-82.

Orroño, D. & R.S. Lavado. Heavy metal accumulation in geranium (*Pelargonium hortorum*) and effects on growth and quality of plants. *Agrochimica*. En prensa.

## ESTRUCTURA DE LA TESIS

La tesis esta organizada en siete capítulos y un Anexo. El capítulo I y II corresponden a la introducción y materiales y métodos generales, respectivamente. La tesis comienza con el Anexo\* que se encuentra al final de la misma. En el Anexo se evaluó inicialmente la tolerancia y capacidad de acumulación de seis metales, en tres especies del género *Pelargonium* (*P. hortorum*, *P. peltatum* y *P. graveolens*). A partir de los resultados obtenidos se decidió trabajar con la especie *P. hortorum* (malvón). La tesis continúa con el capítulo III, en el cual se evalúan la extracción de metales de las fracciones químicas y físicas del suelo y la acumulación en órganos de la especie seleccionada. Luego, en el capítulo IV se estudia la extracción de los metales desde la rizosfera y el volumen del suelo y se estudian interacciones entre metales a nivel suelo y planta. En el capítulo V se investiga el efecto de la longitud del periodo de crecimiento de *P. hortorum* sobre la eficiencia de la fitoextracción, y en el capítulo VI se evalúan los cambios morfológicos inducidos por los metales en las plantas y los efectos sobre la calidad ornamental de *P. hortorum*. Finalmente en el capítulo VII se encuentran la discusión y conclusiones generales.

\*El Anexo se encuentra al final de la tesis por sugerencia de la Comisión de Doctorado.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>CAPÍTULO I. Introducción general</b>	1
1.1 Origen de los contaminantes, con énfasis en los metales	1
1.2 Los metales en los suelos	2
1.3 Contaminación de suelos en la región pampeana	4
1.4 Absorción por plantas y cultivos, daños a los ecosistemas y al hombre	5
1.5 Remediación	8
1.6 Justificación de la tesis	10
1.7 Objetivos generales y objetivos e hipótesis por capítulo	10
<b>CAPÍTULO II. Diseño experimental y métodos en general</b>	12
2.1 Metodología general	12
<b>CAPÍTULO III. Extracción de metales de las fracciones químicas y físicas del suelo y acumulación en órganos de <i>P. hortorum</i></b>	16
3.1 Introducción	16
3.2 Materiales y Métodos	18
3.2.1 Determinación de los metales en raíces, tallos, hojas y flores	18
3.2.2 Fraccionamiento secuencial del suelo	19
3.2.3 Fraccionamiento físico del suelo	19
3.2.4 Correlaciones entre la concentración de metales en los órganos de <i>P. hortorum</i> y la concentración en las fracciones químicas y físicas	19
3.2.5 Análisis estadístico	19
3.3 Resultados	21
3.3.1 Determinación de los metales en raíces, tallos, hojas y flores	21
3.3.2 Fraccionamiento secuencial del suelo	21
3.3.3 Fraccionamiento físico del suelo	24
3.3.4 Correlaciones entre la concentración de metales en los órganos de <i>P. hortorum</i> y la concentración en las fracciones químicas y físicas	25
3.4 Discusión	27
3.5 Conclusiones	30
<b>CAPÍTULO IV. Extracción de metales desde la rizosfera y el volumen del suelo e interacciones entre metales</b>	31
4.1 Introducción	31
4.2 Materiales y métodos	33
4.2.1 Determinación de peso seco por órgano y por tratamiento	34
4.2.2 Determinación de pH, CE y metales disponibles en el SR y SNR	35
4.2.3 Concentración de metales en raíces, tallos, hojas y flores de <i>P. hortorum</i> y correlaciones	35
4.2.4 Análisis estadístico	35
4.3 Resultados	36
4.3.1 Determinación de peso seco por órgano y por tratamiento	36
4.3.2 Determinación de pH, CE y metales disponibles en el SR y SNR	36
4.3.3 Concentración de metales en raíces, tallos, hojas y flores de <i>P. hortorum</i> y correlaciones	38
4.4. Discusión	43
4.5 Conclusiones	45
<b>CAPÍTULO V. Efecto de la longitud del periodo de crecimiento de <i>P. hortorum</i> sobre la eficiencia de la fitoextracción</b>	47
5.1 Introducción	47
5.2 Materiales y Métodos	48
5.2.1 Peso seco total, radical y de los componentes de la biomasa aérea de <i>P. hortorum</i> y cálculos de TIN y TCR	48
5.2.2 Concentración de metales en raíces, tallos, hojas, y flores de <i>P. hortorum</i> y cálculos de la UR	49

5.2.3 Análisis estadístico	49
5.3 Resultados	49
5.3.1 Peso seco total, radical y de los componentes de la biomasa aérea de <i>P. hortorum</i> y cálculos TIN y TCR	49
5.3.2 Concentración de metales en raíces, tallos, hojas, y flores de <i>P. hortorum</i> y cálculos de la UR	51
5.4 Discusión	55
5.5 Conclusiones	57
<b>CAPÍTULO VI. Cambios morfológicos inducidos por los metales y efectos sobre la calidad ornamental de malvón</b>	58
6.1 Introducción	58
6.2 Materiales y Métodos	59
6.2.1 Determinación de área foliar, área de flores, altura y diámetro de planta	59
6.2.2 Determinación de peso seco, relación raíz/parte aérea y TCR de las plantas	59
6.2.3 Análisis estadístico	59
6.3 Resultados	60
6.3.1 Determinación de área foliar, área de flores, altura y diámetro de planta	60
6.3.2 Determinación de peso seco, relación raíz/parte aérea y TCR de las plantas	61
6.4 Discusión	65
6.5 Conclusiones	67
<b>ANEXO. Tolerancia y capacidad de acumulación de seis metales, en tres especies del género <i>Pelargonium</i></b>	68
1. Introducción	68
2. Materiales y métodos	69
2.1 Determinación de peso seco aéreo y radical e Índice de tolerancia (TIN)	69
2.2 Determinación de metales disponibles (DTPA), pH y conductividad eléctrica (CE)	70
2.3 Concentración de macro y micronutrientes en los tejidos las plantas y Factor de Bioconcentración (BCF)	70
2.4 Análisis estadístico	70
3. Resultados	70
3.1 Determinación de peso seco aéreo y radical e Índice de tolerancia (TIN)	70
3.2 Determinación de metales disponibles (DTPA), pH y conductividad eléctrica (CE)	72
3.3 Concentración de macro y micronutrientes en los tejidos las plantas y Factor de Bioconcentración (BCF)	73
4. Discusión	76
5. Conclusiones	78
<b>CAPÍTULO VII. Discusión y conclusiones generales</b>	79
7.1 Síntesis de los resultados principales	79
7.2 Respuestas a los principales interrogantes de la tesis	83
7.3 Relevancia de los resultados obtenidos y respuestas al objetivo general	84
7.4 Contribuciones de la tesis al avance del conocimiento y potenciales líneas de investigación a futuro	85
Referencias	87

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 2.1</b> Resultados del análisis fisicoquímico del suelo control.	12
<b>Cuadro 2.2</b> Niveles aproximados de metales a los que se llevó el suelo mediante el agregado de las sales correspondientes.	13
<b>Cuadro 3.1</b> Valores promedio de metales por tratamiento en el suelo control, nivel M y nivel A.	22
<b>Cuadro 3.2</b> Contenidos totales de metales del suelo control, nivel M y nivel A, extraído mediante el fraccionamiento secuencial del suelo. Valores promedio $\pm$ desvío estándar.	23
<b>Cuadro 3.3</b> Coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) para las relaciones entre el contenido de metales en los órganos de <i>P. hortorum</i> ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) y el contenido de metales en las fracciones del suelo. *Significativo $p < 0,05$ .	26
<b>Cuadro 3.4</b> Ecuaciones de regresión generadas mediante Stepwise para las relaciones entre el contenido de metales en los órganos de <i>P. hortorum</i> ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) y el contenido de metales en las fracciones físicas del suelo.	27
<b>Cuadro 4.1</b> Concentración de metales por tratamiento luego del agregado de las sales solubles. Promedio $\pm$ desvío estándar.	33
<b>Cuadro 4.2</b> pH y CE del SR y SNR en función de los tratamientos. Valores promedio $\pm$ desvío estándar. Los $\cdot$ indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).	37
<b>Cuadro 4.3</b> Concentración $\pm$ desvío estándar de la concentración de metales en flores de <i>P. hortorum</i> a cosecha; los $\cdot$ indican sin repetición. ND (no detectado) y LD (valor del límite de detección).	40
<b>Cuadro 4.4</b> Concentración $\pm$ desvío estándar de metales en flores y hojas senescentes de <i>P. hortorum</i> ; los $\cdot$ indican sin repetición. ND (no detectado) y LD (valor del límite de detección).	40
<b>Cuadro 4.5</b> Coeficientes de correlación de Pearson de las relaciones entre los metales disponibles en SR y SNR y lo acumulado en las plantas. Los $\cdot$ indican correlación significativa.	41
<b>Cuadro 5.1</b> Peso seco total, radical y de los componentes de la biomasa aérea de <i>P. hortorum</i> por tratamiento y momento de cosecha.	50
<b>Cuadro 5.2</b> Acumulación de metales en raíces de <i>P. hortorum</i> por tratamiento y momento de cosecha.	52
<b>Cuadro 5.3</b> Acumulación de metales en hojas de <i>P. hortorum</i> por tratamiento y momento de cosecha.	53
<b>Cuadro 5.4</b> Acumulación de metales en tallos de <i>P. hortorum</i> por tratamiento y momento de cosecha.	53
<b>Cuadro 5.5</b> Acumulación de metales en flores de <i>P. hortorum</i> por tratamiento y momento de cosecha.	54
<b>Cuadro A.1</b> Concentraciones promedio de metales extraídos con DTPA en el suelo ( $\text{mg/kg}$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.	72
<b>Cuadro A.2</b> pH y CE de los suelos por tratamiento. Promedios $\pm$ desvío estándar.	73
<b>Cuadro A.3</b> Concentración de macro y micronutrientes en plantas enteras por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos	73
<b>Cuadro A.4</b> Factores de Bioconcentración para <i>P. hortorum</i> , <i>P. peltatum</i> y <i>P. graveolens</i> en función de los tratamientos.	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 2.1</b> Foto de los tambores utilizados para los ciclos de humedecimiento y secado de los suelos control, nivel M y nivel A.	15
<b>Figura 3.1</b> Esquema del protocolo seguido para la extracción secuencial de metales.	20
<b>Figura 3.2</b> Concentración de metales en raíces, tallos, hojas y flores experimentos 1 y 2. Los * indican que no se pudo realizar el ANOVA por falta de repeticiones.	21
<b>Figura 3.3</b> Contenido relativo de metales (expresado como porcentaje respecto al total) en las cuatro fracciones del suelo control (A), nivel M (B) y nivel A (C). FI: fracción soluble e intercambiable; FII: fracción unida a materia orgánica; FIII: fracción unida a carbonatos; FIV: fracción residual.	24
<b>Figura 3.4</b> Concentración de metales en diferentes fracciones granulométricas en suelo nivel M (a) y nivel A (b). Valores promedio $\pm$ desvío estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).	25
<b>Figura 4.1</b> Esquema del "Rizopot".	34
<b>Figura 4.2</b> Fotos del "Rizopot".	34
<b>Figura 4.3</b> Peso seco promedio $\pm$ desvío estándar de raíces, tallos, hojas y flores. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos $p \leq 0,05$ . En el caso de contaminación simple solo se muestran tendencias.	36
<b>Figura 4.4</b> Concentraciones de metales disponibles (extracción con $\text{CaCl}_2$ ) en el suelo SR y SNR en función de los tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.	38
<b>Figura 4.5</b> Distribución de metales en raíces, tallos y hojas de <i>P. hortorum</i> en función de los tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos $p \leq 0,05$ .	39
<b>Figura 4.6</b> Fotos generales del experimento completo.	41
<b>Figura 4.7</b> Fotos de los diferentes tratamientos.	42
<b>Figura 5.2.</b> Índice de tolerancia (TIN) de plantas de <i>P. hortorum</i> en los tratamientos nivel M y nivel A en función del momento de cosecha. Las medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente ( $p \leq 0,05$ ).	51
<b>Figura 5.3</b> Tasa de crecimiento relativo (TCR) de plantas de <i>P. hortorum</i> en función del momento de cosecha. Las medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente ( $p \leq 0,05$ ).	51
<b>Figura 5.4</b> Tasa de absorción de metales ( $\text{mg/planta/d}^{-1}$ ) de raíces (a) y biomasa aérea (b) en plantas de <i>P. hortorum</i> en el tratamiento control en función del momento de cosecha.	54
<b>Figura 5.5</b> Tasa de absorción de metales ( $\text{mg/planta/d}^{-1}$ ) de raíces (a) y biomasa aérea (b) de <i>P. hortorum</i> en el nivel M en función momento de cosecha.	55
<b>Figura. 5.6.</b> Tasa de absorción de metales ( $\text{mg/planta/d}^{-1}$ ) de raíces (a) y biomasa aérea (b) en plantas de <i>P. hortorum</i> en el tratamiento nivel A en función momento de cosecha.	55
<b>Figura 6.1</b> Área foliar, área de flores, altura y diámetro de tallo del experimento 1 por tratamiento en función del momento de muestreo. Valores promedio $\pm$ desvío estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).	60
<b>Figura 6.2</b> Área foliar, área de flores, altura y diámetro de tallo del experimento 2 por tratamiento en función del momento de muestreo. Valores promedio $\pm$ desvío estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).	61

<b>Figura 6.3</b> Peso seco aéreo y radical experimento 1. Valores promedio $\pm$ desvío estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).	61
<b>Figura 6.4</b> Peso seco aéreo y radical experimento 2. Valores promedio $\pm$ desvío estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).	62
<b>Figura 6.5</b> Relación raíz /parte aérea de los experimentos 1 y 2. Valores promedio $\pm$ desvío estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).	62
<b>Figura 6.6</b> Tasa de crecimiento relativo (TCR) de los experimentos 1 y 2. Valores promedio $\pm$ desvío estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).	63
<b>Figura 6.7</b> Fotos tratamientos nivel M y nivel A respectivamente, experimento 1.	64
<b>Figura 6.8</b> Fotos tratamientos nivel M y nivel A respectivamente, experimento 2.	65
<b>Figura A.1</b> Peso seco aéreo y radical de <i>P. hortorum</i> , <i>P. peltatum</i> y <i>P. graveolens</i> en el suelo control, nivel M y nivel A. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.	71
<b>Figura A.2</b> Índice de tolerancia (TIN) de <i>P. hortorum</i> , <i>P. peltatum</i> y <i>P. graveolens</i> en los tratamientos nivel M y A.	72
<b>Figura A.3</b> Concentración promedio $\pm$ desvío estándar de metales en plantas enteras (mg/kg) por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. *Concentración en planta x 10.	74
<b>Figura A.4</b> Fotos <i>P. hortorum</i> tratamientos control, nivel M y nivel A respectivamente.	75
<b>Figura A.5</b> Fotos <i>P. peltatum</i> tratamientos control, nivel M y nivel A respectivamente.	75
<b>Figura A.6</b> Fotos <i>P. graveolens</i> tratamientos control, nivel M y nivel A respectivamente.	76

**ABREVIATURAS**

As	Arsénico
B	Boro
BCF	Factor de Bioconcentración
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de Calcio
Cd	Cadmio
CE	Conductividad eléctrica
Co	Cobalto
Cr	Cromo
Cr (VI)	Cromo hexavalente
Cr (III)	Cromo trivalente
Cu	Cobre
DTPA	Ácido Dietilen Triamino Pentaacético
Fe	Hierro
FI	Fracción I
FII	Fracción II
FIII	Fracción III
FIV	Fracción IV
Hg	Mercurio
ICP-OES	Espectroscopía de emisión óptica por plasma acoplado inductivamente
Mn	Manganeso
Mo	Molibdeno
Ni	Níquel
Nivel A	Nivel Alto
Nivel M	Nivel Medio
Pb	Plomo
Se	Selenio
SNR	Suelo no rizosferico
SR	Suelo rizosferico
TCR	Tasa de crecimiento relativo
TIN	Índice de Tolerancia
UR	Tasa de Absorción
Zn	Zn

## RESUMEN

### **Acumulación de metales (cadmio, zinc, cobre, cromo, níquel y plomo) en especies del género *Pelargonium*: suministro desde el suelo, ubicación en la planta y toxicidad**

La acción antrópica puede causar la contaminación de los suelos con metales. Para la remediación de pequeñas áreas contaminadas se sugirió el uso de plantas ornamentales. En esta tesis, inicialmente se estudió la capacidad de fitorremediación de tres especies del género *Pelargonium* en un suelo contaminado con cadmio, zinc, cobre, cromo, níquel y plomo, y se seleccionó la más tolerante (*Pelargonium hortorum*). Los objetivos fueron estudiar en qué fracciones químicas y físicas del suelo se ubican los metales, a partir de cuales los absorbe *Pelargonium hortorum* y en qué órgano los acumula, incluyendo la influencia de la rizosfera y el estudio de los fenómenos de sinergismo-antagonismo entre metales. Además, se considera en qué momento del ciclo la planta extrae los metales, y como afectan su capacidad productiva. Para tal fin se determinaron los metales en las fracciones físicas y químicas del suelo, metales totales y disponibles, pH y conductividad eléctrica (CE); en planta, se calcularon diversos índices. Los resultados muestran que los suelos con metales mostraron un incremento en las fracciones más disponibles, y que la absorción de casi todos los metales estuvo relacionada con varias de estas fracciones. Excepto Pb, todos los metales se asociaron principalmente a la fracción arcilla. La acumulación en planta fue raíces > tallos > hojas > flores. En general, la rizosfera no intervino en la regulación de la disponibilidad de los metales y la capacidad de remoción de las plantas se mantuvo estable a lo largo de las cosechas. Finalmente, los parámetros más afectados en planta fueron la formación de nuevas hojas y flores, y el tamaño de las mismas, afectando la calidad comercial del cultivo. La especie estudiada no es hiperacumuladora y su calidad comercial es afectada. Sólo podría utilizarse con fines de remediación cuando la concentración de metales en el suelo no sea muy elevada.

**Palabras clave:** *Pelargonium hortorum*, metales, fraccionamiento químico, fraccionamiento físico, rizosfera, metales disponibles, tasa de absorción de metales.

**ABSTRACT****Accumulation of metals (cadmium, zinc, copper, chromium, nickel and lead) in the genus *Pelargonium*: supply from the soil, plant location and toxicity**

Anthropogenic action can cause the contamination of the soils with metals. For the remediation of small contaminated areas the use of ornamental plants was suggested. In this thesis, we initially examined the ability of phytoremediation of three species of the genus *Pelargonium* in a soil contaminated with cadmium zinc, copper, chromium, nickel and lead, and selected the most tolerant (*Pelargonium hortorum*). The objectives were to study in which chemical and physical fractions of soil are located the metals, from which one does *Pelargonium hortorum* absorb them and in which organ are located, including the influence of the rhizosphere and the study of the phenomena of synergism-antagonism between metals. Furthermore, it is considered in which stage of plant cycle the plant extracts metals, and how they affect their productive capacity. To this end we determined the metals in the physical and chemical fractions of soil, available and total metals, pH and electrical conductivity (EC); several indices were calculated in plants. The results show that spiked soils showed an increase in available fractions, and that almost all the absorption of metals was associated with several of these fractions. Except for Pb, all metals were mainly associated with the clay fraction. Accumulation in plants was roots> stems> leaves> flowers. In general, the rhizosphere was not involved in the regulation of the availability of metals and the removal capacity of the plants remained stable over the crops. Finally, the parameters most affected were plant formation of new leaves and flowers, and size, which affected the commercial quality of the crop. The specie studied is not a hyperaccumulator and commercial quality is affected. It could only be used for remediation when the concentration of metals in the soil is not too high.

**Keywords:** *Pelargonium hortorum*, metals, chemical fractionation, physical fractionation, rhizosphere, available metals, heavy metal uptake rate.

# CAPÍTULO I

## Introducción general

### 1.1 Origen de los contaminantes, con énfasis en los metales

En las últimas décadas, la producción de bienes y servicios ha aumentado en forma exponencial y, con ello, la posibilidad de elevación del nivel de vida de la humanidad. Sin embargo, este hecho ha tenido consecuencias no deseadas para el medio ambiente (Adriano, 2001). Como consecuencia, la sociedad moderna enfrenta el problema de la generación creciente de diferentes tipos de residuos, efluentes y emanaciones. Esos residuos provienen principalmente de la vida urbana, la industria, la minería y la producción agropecuaria (Pais & Benton Jones, 2000; Prasad, 2004). La vida urbana contamina principalmente a través de los residuos domiciliarios, los residuos cloacales y el uso de vehículos de combustión interna. Los desechos y los efluentes cloacales se procesan y disponen de diversas maneras según el nivel de desarrollo de los distintos países. La actividad vehicular supone todavía un aporte de metales pesados a la atmósfera, entre los que se destacan el plomo (Pb) y el cadmio (Cd) (Pais & Benton Jones, 2000; Hjortenkrans y col. 2006; Bakirdere & Yaman, 2008). La industria y la minería aportan numerosas sustancias minerales y orgánicas al medio. La composición de estos efluentes y residuos es muy variable, dependiendo del origen de cada uno de ellos. Los residuos sólidos y líquidos pueden contaminar por contener metales, hidrocarburos e innumerables sustancias orgánicas. Los efluentes gaseosos, suelen contener estas sustancias en suspensión en la masa de aire, lo que les permite trasladarse a grandes distancias (Fergusson, 1990; Alloway, 1995).

Una de las muchas consecuencias ambientales derivadas de la generación de los residuos mencionados es la elevación del tenor de metales en los suelos (Adriano, 2001; Kalavrouziotis y col. 2008). Precisamente, los suelos son uno de los mayores reservorios en los cuales se evidencia la contaminación ambiental (Alloway, 1995). Más del 90 % de los contaminantes producidos son retenidos en las partículas de suelo, mientras que cerca del 9 % de los mismos pasa a los sedimentos acuáticos. La contaminación de un suelo con metales presenta un alto tiempo de residencia, estableciéndose un equilibrio dinámico con la hidrosfera, atmósfera y biosfera y de esta forma se altera el ecosistema, incluyendo al ser humano (Huang, 1999).

En el grupo de los metales se incluye a los “metales pesados”, elementos cuyo peso atómico es superior a 63 y que poseen una densidad mayor que  $5\text{-}6\text{ g dm}^{-3}$ . No obstante ello, existen elementos tóxicos que no son metales y otros no son “pesados”. Estos elementos están listados en la Directiva de la Comisión Europea (Directiva 86/278/CEE, 1986) como productores de daño a la vida de las plantas o animales, cuando sus concentraciones superan ciertos umbrales críticos en los suelos o en las plantas. Entre los metales pesados contaminantes más comunes se encuentran Cd, cromo (Cr), cobre (Cu), níquel (Ni), Pb y zinc (Zn) (United States Environmental Protection Agency, 1997).

El Cd no tiene función biológica esencial y tanto él como sus compuestos son muy tóxicos para plantas y animales (Alloway, 1995). Se lo encuentra en los suelos como resultado de actividades humanas tales como fundición y refinación de metales, la quema de combustibles fósiles, y la aplicación de fertilizantes fosfatados y lodos de depuradora a los suelos (Alloway, 1995; Kabata-Pendias & Pendias, 2000). Su biodisponibilidad en los suelos es generalmente alta en comparación con otros metales como consecuencia de su mayor solubilidad y el predominio de uniones de baja energía con la fase sólida del suelo (Alloway, 1995; Gérard y col. 2000).

El Cr y sus compuestos tienen múltiples usos industriales. Ellos son ampliamente empleados en el tratamiento y acabado del cuero (Nriagu, 1988), en la producción de acero refractario, galvanoplastia, productos de limpieza y en la producción de ácido crómico y especialidades químicas (Shanker y col. 2005). Por lo general, el cromo se presenta en dos formas: la trivalente, Cr (III) y la hexavalente, Cr (VI), y las plantas toman ambas formas. El Cr (III) es poco soluble y menos tóxico, mientras que el Cr (VI) que es más soluble en agua, es altamente tóxico para la biota (Adriano, 2001). Compuestos de cromo hexavalente se utilizan en la industria de revestimientos metálicos, tratamientos de refrigeración de torres de agua, y, hasta hace poco, la preservación de la madera (Shanker y col. 2005).

El Cu es uno de los metales traza más abundantes, es un micronutriente de gran importancia en la producción agrícola y se produce como  $\text{Cu}^+$  y como  $\text{Cu}^{2+}$  (Luo y Christie, 1998). Niveles potencialmente tóxicos de Cu en suelos están generalmente asociados con enmiendas de lodos de depuradora y con fungicidas cúpricos como las sales de cobre (Adriano, 2001). Las concentraciones de Cu en la solución del suelo son extremadamente bajas, con más del 98 % del mismo unido a materia orgánica, independientemente del pH (Sauve y col. 1997).

En 1988, el Ni se incluyó en la lista de los elementos esenciales para las plantas (Brown y col. 1988). Sin embargo, este elemento es fitotóxico cuando está presente en altas concentraciones (Hasinur y col. 2005). Se absorbe como catión  $\text{Ni}^{2+}$  (Uren, 1992) y es transportado rápidamente a los sitios metabólicamente activos, ocasionando múltiples efectos tóxicos en el crecimiento (Krämer y col. 1997). Naturalmente, los suelos derivados de rocas serpentinas son ricos en Ni, pero debido a diversas actividades industriales y antropogénicas, tales como la minería, la refinación de minerales de níquel, la quema de combustibles fósiles y petróleo residual, y al uso de lodos de depuradora otras zonas también se han vuelto susceptibles a la contaminación por Ni (Nriagu, 1988).

Entre los metales pesados de número atómico mayor de 60, Pb es el más abundante en la corteza de la tierra (Adriano, 2001). El nivel de plomo en el medio ambiente ha aumentado considerablemente como resultado de la industrialización y la urbanización (Singh y col. 1997). La vida media del plomo se estima en 150-5000 años (Kumar y col. 1995). La disponibilidad de Pb para las plantas es muy baja estando menos del 0.1% de la concentración de Pb total en la solución del suelo (Huang y col. 1997). Por lo tanto, el aumento de la concentración de Pb en la solución del suelo es crucial para el éxito de la fitoextracción del mismo (Blaylock y col. 1997; Huang y col. 1997; Shen y col. 2002)

Finalmente, las altas concentraciones de Zn en el suelo, son una consecuencia frecuente de las actividades antropogénicas (Alloway, 1995). Las fuentes antropogénicas de contaminación derivan de actividades como la minería y la fundición, la galvanoplastia, la aplicación de lodos industriales y municipales al suelo, el uso de productos químicos agrícolas que contienen Zn, y otras actividades industriales (Blaylock & Huang, 2000; Chaney, 1993). El Zn se encuentra dentro de los elementos traza más móviles y usualmente es débilmente retenido en los suelos (Alloway, 1995).

## 1.2 Los metales en los suelos

El suelo es uno de los componentes del medio ambiente más involucrado en procesos de polución, ya que actúa como sumidero y, a la vez, fuente de contaminantes (Zhu & Alba, 1993). De los constituyentes del suelo, las arcillas han mostrado una alta capacidad de sorción de metales como el Cu y Zn, dependiendo del pH (Cavallaro & McBride, 1984). La presencia de carbonatos en los suelos también afecta la capacidad retención de metales. Comparando suelos ácidos y suelos

calcáreos, Saeed & Fox (1997) observaron la existencia de relaciones entre el incremento del pH y la disminución de la solubilidad de metales.

Entre los insumos agrícolas que aportan estos contaminantes inorgánicos a los suelos y los cultivos se encuentran fertilizantes, calcáreo y yeso, enmiendas orgánicas (biosólidos, estiércol de animales domésticos y residuos industriales), pesticidas y demás agroquímicos, agua de riego y otros (Ferguson, 1990; Nicholson y col. 2003). El Cd es de particular interés porque se encuentra en relativa abundancia en fertilizantes y biosólidos. La adición de residuos o fertilizantes conteniendo alta concentración de Cd a tierras agrícolas, puede ocasionar importantes incrementos en la absorción de Cd por los cultivos (Grant y col. 1999). Por ejemplo, Andersson y Siman (1991) informaron aumentos en los niveles de Cd en cultivos que recibieron dosis crecientes de fertilización fosforada. Esto es dependiente del pH, ya que los incrementos del pH favorecen la adsorción de Cd en el complejo de intercambio y la disminución de Cd en la solución del suelo (McBride y col. 1997; Sauvé y col. 2000). En un estudio de la dinámica de los metales en dos tipos de biosólidos aplicados en suelos, se observó que el Cd fue el elemento más móvil desde el biosólido al suelo y de éste a la planta y, finalmente, a los granos de maíz (Lavado y col. 2005).

Además de los biosólidos, que han sido extensamente estudiados, se destaca la importancia de los estiércoles actuales. Por ejemplo, algunos metales como arsénico (As), cobalto (Co), Cu, hierro (Fe), manganeso (Mn), selenio (Se) y Zn integran la dieta de pollos y otros animales domésticos con varios propósitos, elevando claramente las concentraciones de metales en los estiércoles (Sims y col. 1994). Por ello, se encuentran altas concentraciones de metales en suelos enmendados con estos residuos. Asimismo, el uso de altos niveles de Cu para estimular el crecimiento y aumentar la eficiencia en la alimentación de cerdos elevó las concentraciones de Cu en el estiércol de estos animales. Luego de largos periodos de aplicación de estiércol con altas concentraciones de este elemento, se encontró que el Cu se había acumulado en los suelos y en plantas como pastos y maíz (Payne y col. 1988).

La acumulación de metales en el suelo, no sólo afecta a cultivos y plantas silvestres, sino que en casos extremos provoca la contaminación de aguas subterráneas y superficiales por escorrentía y lixiviación (Han y col. 2000; Cogger y col. 2001). Muchos de estos elementos son fácilmente asimilados por las plantas y algunos de ellos (Cd, Cu, Ni, Pb y Zn) significan una amenaza para el medio ambiente y la salud, debido a su toxicidad potencial y acumulación en la cadena alimenticia (Pietz y col. 1984; McLaughlin y col. 1999). También puede resultar afectada la flora del suelo, como lo demostró la inhibición microbiana en la descomposición de residuos de coníferas y el reciclado de los nutrientes, observado en un bosque que rodeaba a una fundición de latón. Dicha industria, había emitido grandes cantidades de Cu, Zn y otros metales en forma de aerosol por algunos años (Tyler, 1989).

Por otro lado, el comportamiento de los metales en el medio ambiente está determinado por sus formas fisicoquímicas específicas, más que por su concentración total (Tack & Verloo, 1995). Se considera que hay una relación cercana entre la concentración de elementos traza extractables en los suelos y la toma y acumulación de metales por los cultivos (Fergusson 1990; Chojnacka y col. 2005). En los suelos, los metales se distribuyen en varias formas, relacionadas, en mayor o menor grado, con su disponibilidad para las plantas. Estas formas químicas se clasifican en los siguientes grupos: i) soluble en agua, intercambiable y adsorbido; ii) ligado a la materia orgánica; iii) asociado a componentes inorgánicos, tales como carbonatos, óxidos, sulfuros; iv) residual, que agrupa los compuestos no incluidos en los grupos anteriores, generalmente aluminosilicatos.

Los estudios de correlación entre estas formas químicas y el grado de absorción de los metales por las raíces han mostrado resultados variables. En algunos casos las formas solubles, intercambiables y ligadas a la materia orgánica fueron disponibles para las plantas (Zhu & Alva, 1993). En otros, la movilidad y biodisponibilidad de varios metales, fue muy baja en la fracción unida a la materia orgánica (He & Singh, 1993). En suelos de la región pampeana se encontró que la concentración de metales extractables con EDTA no siempre presentó alta correlación con los contenidos de ellos en cultivos como maíz y trigo. Inclusive, en algunos casos se encontraron altas correlaciones entre los contenidos de metales totales en suelos y en planta (Lavado y col. 2006).

Los metales de fuentes antropogénicas son potencialmente más móviles que los heredados del material geológico (Kabata-Pendias, 1993). Los metales nativos se encuentran frecuentemente en formas altamente inmóviles (Ross, 1994) mientras que las formas antropogénicas son frecuentemente más reactivas y, en consecuencia, más disponibles para las plantas. En suelos tratados con sales de elementos traza (metal-spiking studies) con el fin de simular el efecto de los metales contenidos en residuos, se sobrestima la biodisponibilidad de los mismos (Basta y col. 2005). Esta mayor biodisponibilidad de los metales aplicados en la forma de sales ha sido demostrada tanto en experimentos con macetas en invernáculo (Korcak & Fanning, 1985), como en condiciones de campo en suelos enmendados con biosólidos. Efectivamente, el contenido de Cd en lechuga resultó tres veces mayor en suelos tratados con sales, que en suelos con biosólidos (Brown y col. 1998).

Una forma complementaria de considerar los contenidos de contaminantes es su distribución en los diferentes tamaños de partículas presentes en el suelo (Lu y col. 2005; Li y col. 2006). Yarlagadda y col. (1995) encontraron concentraciones elevadas de Pb y Cu en todas las fracciones texturales. La unión de los metales pesados en varias fracciones tiende a incrementarse con la disminución en el tamaño de agregados, lo cual sugiere que los mecanismos de unión superficial controlan la distribución de estos elementos a través de las distintas fracciones de tamaño de agregados (Zhang y col. 2003). Mogollon y col. (1995), por su parte, informaron que las concentraciones de varios elementos investigados fueron mayores en los tamaños de partículas más finas.

### **1.3 Contaminación de suelos en la región Pampeana**

La Región Pampeana es una de las regiones de cultivos extensivos de clima templado más importante de Hemisferio Sur. La región abarca aproximadamente 60 millones de hectáreas y cubre, en diferentes proporciones, a las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos, San Luis y La Pampa. Es el centro de la actividad productiva agropecuaria argentina, donde se desarrollan cultivos de verano como soja, maíz y girasol, y de invierno como trigo y cebada. Los suelos predominantes en el área pertenecen al Orden de los Molisoles, destacándose entre ellos Argiudoles, Hapludoles, Haplustoles y otros subgrupos. En esta región se ubican las principales ciudades de la Argentina, en donde vive la mayoría de nuestra población (Lavado, 2006a).

La mayoría de los suelos agrícolas de la región Pampeana no muestran signos de contaminación con metales. Las concentraciones y valores de dispersión de metales en estos suelos son similares a las observadas en otros suelos no contaminados del mundo (Lavado y col. 2004). La razón principal es que en la región existe baja densidad poblacional, no existen la minería metalífera y las fábricas están localizadas en las inmediaciones de las ciudades. La distribución de los metales en los

suelos muestra un patrón de máxima concentración en el horizonte B<sub>2</sub> o un incremento de la concentración hacia la profundidad del suelo. Los patrones de distribución dependen de cada metal y del tipo de suelo (Lavado y col. 2004). Como se ha informado para otras regiones del mundo, esta forma de distribución de los metales en los perfiles de suelos está principalmente relacionada al material parental y los procesos pedogénéticos; no está conectado con contaminación antropogénica. Esto concuerda con lo registrado previamente en el área en estudio (Lavado & Porcelli, 2000), donde boro (B), Cr, Cu, Pb y Zn se encontraron principalmente en las fracciones insolubles, nuevamente un indicador de que no existe origen de contaminación en las zonas agrícolas lejanas a las poblaciones.

El riesgo potencial de contaminación antropogénica de estos suelos estaría ligado a los fertilizantes, agroquímicos o al uso de barros cloacales digeridos anaeróbicamente (biosólidos) o estiércoles (Lavado y col. 2005; Lavado y col. 2006b). En un ensayo de largo plazo, se encontró un leve incremento de Co, Cu, Pb y Ni, atribuido a la aplicación de fertilizantes fosfatados (Lavado y col. 1999). Sin embargo, en otro estudio similar, no se observó una acumulación significativa de metales (Zubillaga & Lavado, 2002). De todas maneras, hasta el momento, los fertilizantes no han sido utilizados en forma masiva en los cultivos extensivos.

Sin embargo, frente a ese panorama general, algunas áreas localizadas de la región han comenzado a mostrar el conocido proceso de acumulación antropogénica de metales documentado en otras áreas del mundo (Fergusson, 1990). Suelos ubicados en los cinturones hortícolas, alrededor de las ciudades como por ejemplo Bahía Blanca, muestran niveles tóxicos de Cu y Zn, atribuidos al uso intensivo de agroquímicos, fertilizantes y enmiendas (Reyzábal y col. 2000). Por otro lado, los suelos de la ciudad de Buenos Aires difieren significativamente en el contenido de metales respecto de los suelos agrícolas o con pasturas circundantes. Esto es principalmente debido a industrias, tráfico vehicular y otras fuentes de contaminación. En estos suelos urbanos, las concentraciones de Cd, Cu, Pb y Zn fueron mucho mayores que los límites de varios estándares internacionales, como por ejemplo la Organización Mundial de la Salud (Lavado y col. 1998). Los suelos de áreas industriales y de áreas residenciales de la ciudad difieren en las concentraciones de estos elementos (Llosa y col. 1990). También, los suelos del Gran La Plata localizados cerca de rutas y autopistas, están enriquecidos en Pb y Zn (Camilión y col. 1995). En áreas suburbanas industrializadas también se encontraron elevados valores de metales pesados e hidrocarburos de petróleo (Andrade y col. 2002)

En síntesis, por sus características demográficas y productivas la región pampeana no ha sufrido hasta el presente un gran impacto de acumulación de metales. Sin embargo, en la periferia de las ciudades y pueblos se llevan a cabo innumerables actividades productivas, entre ellas producciones animales y agrícolas intensivas, proyectos agroindustriales, desarrollo de variados tipos de espacios verdes, etc. Estas actividades están haciendo uso de tecnologías que implican la utilización de un alto nivel de insumos. A ello se suman los procesos de orden general (deposición atmosférica, por ejemplo) que contribuyen a incrementar los problemas ambientales con metales en estas zonas periurbanas.

#### **1.4 Absorción por plantas y cultivos, daños a los ecosistemas y al hombre**

Como se analizó previamente, la acumulación de metales en las plantas es un serio tema medioambiental, ya que la absorción de metales por éstas, es el proceso más importante por el cual los metales pueden entrar en la cadena alimentaria (Quian y col. 1996). Las plantas cultivadas en suelos contaminados absorben, concentran y

precipitan metales tóxicos en su biomasa y se convierten en la mejor alternativa para áreas con contaminación difusa, donde los polutantes se presentan en relativamente baja concentración y superficialmente (Rulknes y col. 1998).

Las plantas poseen 3 estrategias básicas para crecer sobre suelos contaminados (Raskin y col. 1994). La primera se presenta en plantas exclusoras de metales, las cuales previenen la entrada de metales o mantienen baja y constante la concentración de estos sobre un amplio rango de concentración de metales en el suelo, principalmente restringiendo la acumulación de los metales en las raíces. La segunda se encuentra en las plantas denominadas indicadoras de metales, que acumulan los mismos en sus tejidos aéreos y generalmente reflejan el nivel de metal en el suelo (Ghosh & Singh, 2005). Finalmente, la tercera estrategia es la de las plantas acumuladoras, las cuales pueden concentrar metales en sus partes aéreas, en niveles que exceden varias veces el nivel presente en el suelo (Rotkittikhun y col. 2006). Se trata de plantas hiperacumuladoras, capaces de absorber altos niveles de contaminantes y concentrarlos en raíces, tallos y hojas (Raskin y col. 1994; Cunningham & Ow, 1996). Es sabido que la tasa de remoción de metales depende de la biomasa cosechada y de la concentración de metal en ésta última. En especies comunes, no-acumuladoras, el bajo potencial para la bioconcentración de metales es frecuentemente compensado por la producción de una biomasa significativa (Ebbs y col. 1997).

Los órganos de las plantas difieren en su capacidad para acumular metales. En la mayoría de las plantas, raíces, tallos, hojas, frutos y semillas presentan diferentes niveles de concentración y acumulación de metales pesados (Kloke y col. 1994). El factor de translocación describe la relación entre metales pesados en la parte aérea de las plantas respecto a los mismos en raíces. Factores de translocación mayores a 1 sugieren gran capacidad para transportar metales desde las raíces a los vástagos, explicada en su mayor parte por eficientes sistemas de transporte de metales (Zhao y col. 2002) y, probablemente, por secuestro de metales en las vacuolas de las hojas y en el apoplasto (Lasat y col. 2000). Las plantas hiperacumuladoras se caracterizan por una relación concentración de metal parte aérea/ concentración de metal raíz, mayor a 1. En cambio, las plantas no acumuladoras tienen una más alta concentración de metal en raíces que en hojas y tallos (Baker, 1981; Brown y col. 1995). Kloke y col (1994) presentaron un orden general de coeficientes de transferencia entre suelo y planta para la mayoría de los metales biológicamente importantes. El coeficiente de transferencia es la relación entre la concentración del metal en el tejido de la planta y la concentración total del metal en el suelo. Cuando la fuente de metales pesados es el suelo, en general los niveles decrecen en el orden: raíces > tallos > hojas > frutos > semillas. Por ejemplo, plantas jóvenes de girasol (*Helianthus annuus*) creciendo en solución nutritiva suplementada con Cd, Cu, Pb y Zn acumularon metales especialmente en las raíces y en los tallos (Kastori y col. 1992). Los aportes por deposición aérea pueden cambiar el orden, especialmente para Pb. Chaney & Giordano (1977) clasificaron al B, Cd, Mn, Mo (molibdeno), Se y Zn como elementos fáciles de translocar a la parte superior de las plantas Ni, Co y Cu como intermedios, y Cr, Pb y Hg (mercurio) como los translocados en última instancia.

Las plantas pueden absorber grandes cantidades de metales, pero las raíces generalmente acumulan la mayor parte y, frecuentemente, constituyen el sitio de almacenamiento de ellos. Se evita así que dosis tóxicas se transloquen a los tallos y granos (Grifferty & Barrington, 2000). El transporte a través de la membrana celular de la raíz es un proceso importante que inicia la absorción de metales; la carga eléctrica previene la libre difusión de iones metálicos desde las membranas celulares hacia el citosol (Lasat, 2002). Lorenz y col. (1997) sugirieron que los estudios sobre la biodisponibilidad potencial de metales deberían considerar los efectos de la rizosfera

sobre la solución del suelo, debido a que las propiedades de la solución cambian durante el desarrollo de ésta, y la amplitud de los cambios varía enormemente entre suelos. Estos autores se basaron en la alta correlación observada entre la concentración de Cd en la solución de la rizosfera y la concentración de Cd en los tejidos vegetales de plantas de arveja.

Normalmente, las plantas poseen diferentes mecanismos de resistencia al estrés causado por los metales pesados. Brune y col. (1994) discutieron los mecanismos de tolerancia al Zn en plantas, y propusieron 5 mecanismos para su regulación citoplasmática: 1) baja absorción a través de la membrana plasmática, 2) secuestro en organelas subcelulares, 3) precipitación como sales insolubles, 4) complejación con ligandos orgánicos de bajo peso molecular, y 5) extrusión activa desde de la membrana plasmática hacia el apoplasto. Lasat y col. (1998) establecieron que el secuestro dentro de las vacuolas radicales previene la translocación de Zn desde las raíces a los tallos en *Thlaspi arvense* (especie no acumuladora emparentada con la especie hiperacumuladora *T. caerulescens*); en *T. caerulescens*, en cambio, el mecanismo de secuestro vacuolar no es funcional, permitiendo la translocación e hiperacumulación de Zn en hojas. Por otro lado, la síntesis de fitoquelatinas es inducida por algunos metales (Gasic & Korban, 2007); las mismas han mostrado estar involucradas principalmente en la tolerancia de especies vegetales a Cd y Cu (Ow, 1996; Usha y col. 2007). También ha sido documentado que algunas plantas catalizan reacciones redox y alteran la química de los iones metálicos. En este sentido, Lytle y col. (1998) observaron que en solución suplementada con Cr (VI) (tóxico), el jacinto de agua (*Eichornia crassipes*) acumuló Cr (III) (menos tóxico) en raíces y tallos; esta reducción de Cr (VI) a Cr (III) aparentemente tuvo lugar en las raíces finas laterales. Lee y col. (1977) sugirieron que la complejación con compuestos orgánicos de bajo peso molecular jugaría un rol importante en la tolerancia a Ni en plantas acumuladoras.

La contaminación del suelo con Cu, Ni y Zn causada por desperdicios mineros y de fundiciones es conocida por ser fitotóxica tanto para las plantas silvestres sensibles como para los cultivos (Chaney y col. 1999). Por ejemplo, la concentración de metales en el agua y sedimentos de ríos contaminados por efluentes provenientes de industrias y minas (Siegel, 2002; Conesa & Jiménez-Cárceles, 2007) causa acumulación en plantas acuáticas de aguas dulces, y en sistemas marinos y de estuarios (Hansen y col. 1998; Odum y col. 2000).

Asimismo, el suelo es la fuente de los metales biológicamente activos que pueden afectar adversamente la salud humana en varias formas (Duruibe y col. 2007). Pueden causar enfermedades mediante su entrada directa al cuerpo a través de consumo o inhalación, y a través de heridas (Oliver, 1997). Para algunos elementos hay claras evidencias de que son causa de enfermedades, como sucede en comunidades aisladas que se proveen la mayoría de sus alimentos localmente (Mills, 1987). Cadmio y Zn, por ejemplo, pueden conducir a daño gastrointestinal y respiratorio agudo y a daños agudos en el corazón, el cerebro y el hígado. Se conocen enfermedades crónicas en seres humanos expuestos a largos períodos de ingestión de metales pesados, incluyendo efectos locales sobre la piel y mucosas, y varios efectos sistémicos sobre los intestinos (Friberg y col. 1986). El Cd es retenido en el cuerpo humano por varios años, por lo que el consumo de alimentos con altos contenidos de Cd puede inducir toxicidad crónica (Jackson y Alloway, 1992; FAO/WHO, 1995). Se conocen enfermedades en seres humanos causadas por Cd (Nogawa y col. 1987; Cai y col. 1990), Se (Yang y col. 1983) y Pb (Chaney y col. 1999). La contaminación con Pb es una de las más preocupantes desde el punto de vista de la salud humana. El Pb ingresa al cuerpo con los alimentos, o través de

ingestión directa del suelo, o por inhalación de polvo. Los cereales y el agua aportan con el 35% de la toma diaria de Pb (WHO, 1996)

Finalmente, los animales requieren adecuadas cantidades de micronutrientes (Cakmak & Marschner, 1987), pero la acumulación de un exceso de metales como Cd o Pb puede ser extremadamente peligrosa. Existen evidencias de envenenamiento por Se en el ganado vacuno y la vida silvestre (Ohlendorf y col. 1986).

## 1.5 Remediación

Una vez producida la contaminación, se deben tomar las medidas necesarias con el fin de impedir sus efectos nocivos. Para ello se utilizan las estrategias de remediación. La remediación es el conjunto de técnicas que se aplican con el fin de eliminar o reducir la carga de elementos contaminantes en los suelos, por debajo de niveles tóxicos. Entre ellas se destaca la “fitorremediación”, que es la utilización de plantas para eliminar contaminantes del suelo (Chaney y col. 1997). El objetivo primario de la fitorremediación es maximizar la transferencia de contaminantes hacia la parte aérea de las plantas, de modo que parte de la masa total de contaminante sea removida en cada cosecha. Esta técnica posee utilidad práctica potencial, con mayor efectividad y menor costo que otras actualmente en uso. Un sistema eficiente de fitorremediación requiere especies de plantas que satisfagan 2 prerrequisitos: tolerancia a metales y capacidad de acumulación (absorción, detoxificación y secuestro). Además la planta ideal debería poseer la habilidad de sobrevivir a más de un metal en el medio de crecimiento (Saxena y col. 1999).

Las plantas consideradas para fitoextracción deben ser eficientes en translocar los metales desde las raíces a sus partes cosechables (Blaylock & Huang, 2000; Pilon-Smits, 2005). Además, deben poseer otras características deseables como: habilidad para tolerar condiciones extremas en el suelo (pH, salinidad, estructura, contenido de agua), denso sistema radical, facilidad para establecerse, y alta resistencia a enfermedades y ataques de insectos. En los últimos años, la fitorremediación es motivo de intensos debates en los ambientes académico-científicos y profesionales. El debate se refiere al empleo de especies con alta capacidad de acumulación (hiperacumuladoras) pero que poseen baja productividad de biomasa o, por el contrario, el empleo de especies de alta productividad, aunque con menor capacidad de extracción (Ebbs y col. 1997).

Con el fin de evaluar la capacidad de acumulación de distintas especies han sido propuestos diferentes índices de acumulación de metales. Entre ellos, el índice de tolerancia (TIN) el cual cuantifica el crecimiento de las plantas en el suelo contaminado en relación al crecimiento de las mismas en el suelo control, en porcentaje (Antosiewicz, 1995). Este índice decrece a medida que la concentración de metales en el suelo o en la planta se incrementa (Audet & Charest, 2007). Otro índice es la tasa de crecimiento relativo (TCR) de las plantas medida en  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso seco $\cdot\text{d}^{-1}$ ; la misma es importante desde el punto de vista de la biomasa producida y a fin de cuantificar el nivel medio de acumulación de metales (Lutts y col. 2004). Finalmente, el último índice utilizado es la tasa de absorción (UR) de metales ( $\text{mg}\cdot\text{planta}\cdot\text{d}^{-1}$ ) ya que brinda una aproximación de la eficiencia de absorción de los mismos (Singh & Agrawal, 2007).

Las investigaciones iniciales en fitorremediación promovían el uso de especies “hiperacumuladoras” como *Thlaspi caerulescens* (Brown y col. 1995). El término hiperacumulador se refiere a plantas capaces de absorber 100 veces más metales que el resto de las especies (Baker & Brooks, 1989). La lista de plantas acumuladoras de

metales ha llegado a más de 400 especies; la mayoría son altamente metal-específicas, poseen escasa biomasa, su crecimiento es lento y requieren cuidadoso manejo y manipulación con técnicas agrícolas especiales bajo condiciones de campo (Gleba y col. 1999). Algunos investigadores sugirieron hace unos años, que el pequeño tamaño y lento crecimiento de estas especies limita su utilidad para fitorremediación (Brown y col. 1995). Así, la identificación de nuevas especies de plantas con alta producción de biomasa y crecimiento robusto, sumada a su habilidad para tolerar y acumular metales múltiples se han convertido en un importante aspecto para la fitorremediación (Blaylock y col. 1997; McGrath, 1998). Desafortunadamente, todavía no han sido identificadas plantas silvestres ni cultivadas que combinen estas propiedades (Li y col. 2003). Para Pb, uno de los mayores contaminantes del suelo, no se han identificado especies hiperacumuladoras, aunque varias especies han mostrado tener cierta capacidad de acumulación (Berti & Cunningham, 1993).

Por otro lado, se han desarrollado prácticas para incrementar el potencial de plantas comunes no acumuladoras para la fitoextracción de Pb. Por ejemplo, maíz (*Zea mays*) (Huang & Cunningham, 1996) y mostaza indica (*Brassica juncea*) (Blaylock y col. 1997) fueron exitosas para remover Pb de la solución de suelos contaminados, bajo condiciones inducidas por quelatos. Otros autores (Turgut y col. 2004; Cui y col. 2004) utilizando EDTA más ácido cítrico o EDTA más azufre elemental incrementaron la movilización y acumulación de Cd, Cr, Ni, Pb y Zn en cultivos como girasol (*Helianthus annuus*), trigo de invierno (*Triticum aestivum L.*) y mostaza indica (*Brassica juncea*). Varios trabajos sugieren que especies de acumulación moderada y alta biomasa, como la mostaza indica, podrían ser más efectivos que *T. caerulescens* en la fitoextracción del Zn (Kumar y col. 1995; Ebbs y col. 1997). Por ejemplo, Ebbs y col. (1997) informaron que *B. juncea* removió 4 veces más Zn que *T. caerulescens*, debido primordialmente al hecho de que produjo cuatro veces más biomasa.

En los últimos años, la ingeniería genética está comenzando a emerger como una forma relativamente rápida y efectiva para incrementar la capacidad de las plantas de tolerar y acumular metales. Con el fin de desarrollar el potencial de fitoextracción de metales Brown y col. (1995) y Clemens y col. (2002) propusieron la transferencia del fenotipo acumulador de las especies hiperacumuladoras de pequeño porte y lento crecimiento a plantas no acumuladoras de alta producción de biomasa y rápido crecimiento (Bañuelos y col. 2005). Recientemente, han sido creadas plantas transgénicas con alta tolerancia y capacidad de acumulación de metales a través de varias aproximaciones, incluyendo sobreexpresión de proteínas transportadoras de metales (Curie y col. 2000)

En áreas contaminadas de pequeñas superficies, se ha sugerido el uso de especies ornamentales, por ejemplo crisantemo (*Crysanthemum sp.*) (Prasad & Freitas, 2003). Kirkham (1978) observó que las raíces de crisantemo acumularon 10 veces más Cd que los tallos y las hojas cuando crecieron en solución de cultivo suplementada con este elemento. Las hojas de la planta ornamental *Nerium oleander* colectadas de áreas urbanas de Portugal acumularon más de 78 mg de Pb por g de peso seco (Freitas y col. 1991). La Canna (*Canna x generalis*) es una ornamental cultivada en áreas urbanas; los cultivos en hidroponía de esta especie tratados con Pb durante un mes, prueban que la misma es adecuada para fitoextracción de Pb, ya que produce una apreciable cantidad de biomasa. También se ha estudiado una especie del género *Pelargonium* (Trampczynska y col. 2001 tomado de Prasad & Freitas, 2003).

Finalmente, otro aspecto asociado con la aplicación de la fitorremediación es el manejo y disposición de los restos de la biomasa cosechada, problema cuyo tratamiento escapa a la presente tesis.

## 1.6 Justificación de la tesis

El punto de partida de la presente tesis es que la contaminación de suelos en los ambientes que constituyen el límite entre el campo y la ciudad va asumiendo características preocupantes en el mundo y, particularmente, en nuestro país. No se trata de ambientes absolutamente urbanos, donde la problemática incluye por ejemplo el ruido, y donde las soluciones son de disciplinas lejanas a la agronomía. Por el contrario, los ambientes periurbanos poseen fuertes rasgos rurales en conjunto con los rasgos ciudadanos. Muchos de sus problemas y sus eventuales soluciones son, en realidad, una especialidad agronómica. Por ejemplo, la fitorremediación es una práctica agrícola con la diferencia que el producto cosechado no se destina a alimento o fibra, sino a otros fines.

Recientemente, se estudió en soluciones nutritivas la tolerancia de plantas de una especie de geranio (*Pelargonium sp.* "Frensham"), cuando fueron expuestas a varios niveles de Cd, Ni (Dan y col. 2002) y Pb (KrishnaRaj y col. 2000). Según estos autores, esta especie de geranio presenta hipertolerancia a estos metales, en el tiempo y las condiciones experimentales aplicadas. La especie fue capaz de extraer y almacenar en sus raíces cantidades de Pb, Cd y Ni equivalentes al 9,0; 2,7 y 1,9% de su peso seco, respectivamente (Saxena y col. 1999). Si estas tasas de acumulación fueran mantenidas bajo condiciones de campo, este geranio podría ser capaz de remediar sitios fuertemente contaminados en menos de 10 años. Sin embargo, el crecimiento y absorción en solución nutritiva es extremadamente diferente al obtenido en el suelo; los cultivos en hidroponía no son indicadores de la situación real del suelo, debido a competencia iónica, impedancia radical, y al hecho de que las plantas no desarrollan pelos radicales cuando están creciendo en solución (Prasad & Freitas, 2003).

El género *Pelargonium*, que es fácilmente cultivable y se adapta a condiciones ambientales de clima templado, posee una serie de características que lo convierten en buen candidato potencial para fitorremediación: denso follaje para secuestrar altas cantidades de iones metálicos, prolífico sistema radical, adaptabilidad a una amplia variedad de suelos y relativamente bajos requerimientos de agua y nutrientes. Posee además, dos ventajas inapreciables: la biomasa cosechada es un producto de valor económico y se adapta para ser cultivada en áreas pequeñas, como las zonas urbanas y periurbanas.

## 1.7 Objetivos generales y objetivos e hipótesis por capítulo

El objetivo general de la presente tesis es estudiar la capacidad de fitorremediación en un suelo contaminado con Cd, Zn, Cu, Cr, Ni y Pb de una especie del género *Pelargonium*, eventualmente apta para pequeñas superficies donde sería cultivada con beneficio económico. Para seleccionar la especie a estudiar se efectuó un experimento preliminar, que se presenta en el Anexo, al final de la tesis.

Los objetivos e hipótesis por capítulo son los siguientes:

### **CAPÍTULO III. Extracción de metales de las fracciones químicas y físicas del suelo y acumulación en órganos de *P. hortorum***

**Objetivo 3.1:** Investigar en qué órgano de la especie *P. hortorum*, seleccionada como la más promisoría en el Anexo, se produce la mayor acumulación de los metales.

**Objetivo 3.2:** Establecer cuáles son las formas químicas del suelo a partir de las cuales extrae los metales la especie *P. hortorum*

**Objetivo 3.3:** Estudiar cuales son las fracciones texturales del suelo a partir de las cuales extrae los metales dicha especie del género *Pelargonium*.

**Hipótesis 3.1:** La mayor acumulación se producirá en las raíces de las plantas, aunque los restantes órganos también acumularán cantidades importantes de metales.

**Hipótesis 3.2:** La absorción de metales por parte de *P. hortorum* estará relacionada con las formas químicas más rápidamente disponibles en el suelo, especialmente con las fracciones I (fracción soluble) y II (fracción unida a materia orgánica)

**Hipótesis 3.3:** La alta proporción de limo y arcilla en el suelo determinará que la absorción de metales por parte de *P. hortorum* esté relacionada con las fracciones finas (menores a 0,002mm) y medias (0,05-0,002).

#### **CAPÍTULO IV. Extracción de metales desde la rizosfera y el volumen del suelo e interacciones entre metales**

**Objetivo 4.1:** Evaluar la relación entre los metales acumulados en plantas de *P. hortorum* y los metales provenientes de la rizosfera o del volumen de suelo.

**Objetivo 4.2:** Evaluar la diferencia en la absorción de metales desde la rizosfera, de cada elemento en forma individual o cuando se encuentra en conjunto con otros.

**Hipótesis 4.1:** Si bien, en general, la absorción de metales por parte de la especie *Pelargonium* se vincula principalmente con la rizosfera, el aporte del volumen del suelo varía según el elemento que se considere.

**Hipótesis 4.2:** La diferencia o similitud en la absorción entre los elementos solos o en conjunto con otros se relaciona con la presencia de relaciones antagónicas/sinérgicas entre ellos.

#### **CAPÍTULO V. Efecto de la longitud del periodo de crecimiento de *P. hortorum* sobre la eficiencia de la fitoextracción**

**Objetivo 5.1:** Determinar la acumulación de metales y su tasa de absorción en la biomasa de raíces, tallos, hojas y flores de *P. hortorum* a lo largo de diferentes momentos de cosecha.

**Objetivo 5.2:** Evaluar el potencial de diversos índices de acumulación de metales para registrar las variaciones en la producción de biomasa de *P. hortorum* y la concentración de metales.

**Hipótesis 5.1:** El cultivo presenta una alta velocidad de extracción de los metales inicial pero su mayor acumulación se registra en las hojas en los momentos de máximo crecimiento.

**Hipótesis 5.2:** Las variaciones en producción de biomasa y acumulación de metales a lo largo del periodo de crecimiento serán reflejados en forma coincidente por los diferentes índices.

#### **CAPÍTULO VI. Cambios morfológicos inducidos por los metales y efectos sobre la calidad ornamental de malvón**

**Objetivo 6.1:** Cuantificar el efecto de los metales sobre la calidad ornamental de la especie *P. hortorum*.

**Hipótesis 6.1:** El aumento en la concentración de metales no afecta significativamente la calidad ornamental del cultivo, pero si tiene efectos sobre el tiempo de producción.

## CAPÍTULO II

### Diseño experimental y métodos en general

#### 2.1 Metodología general

La metodología aplicada consistió, en general, en experimentos en contenedores, en condiciones controladas en invernáculo, a partir de suelos enriquecidos con metales y trabajos de laboratorio. Los experimentos en macetas utilizaron como tratamientos un suelo control (Cuadro 2.1) y dos suelos con niveles de contaminación medio y alto con seis metales.

**Cuadro 2.1** Resultados del análisis fisicoquímico del suelo control.

Parámetros	
pH	5,9
C.E.(dS/m)	0,4
P(p.p.m.)	10,4
CO (%)	2,2
Arcilla (%)	22,5
Limo (%)	67,5
Arena (%)	10
Clase Textural	Franco Limoso
Ca (meq/100g)	9,5
Mg (meq/100g)	1,8
Na (meq/100g)	0,5
K (meq/100g)	1,2
CIC (meq/100g)	16,9

CO: carbono orgánico; CIC: capacidad de intercambio catiónico.

Las muestras del suelo control se secaron al aire y se tamizaron por una malla de 2 mm. Posteriormente, utilizando técnicas analíticas estándar (Sparks, 1996) se determinaron pH y conductividad eléctrica (CE) en agua (relación suelo:agua de 1:2,5), fósforo disponible (P Olsen), carbono orgánico (por digestión con el método Walkley & Black), textura (método del hidrómetro de Bouyoucos), bases intercambiables (extracción con acetato de amonio 1 mol/L a pH 7), la capacidad de intercambio catiónico (CIC) por saturación con acetato de sodio 1M a pH 8,2 y desplazamiento del sodio adsorbido con acetato de amonio 1M a pH 7,0.

El suelo utilizado en los contenedores fue el horizonte A de un Argiudol Típico (suelo no contaminado) del cual se tomó una alícuota como control; el resto del suelo se sometió a 2 niveles de enriquecimiento con seis metales: nivel medio (nivel M) y nivel alto (nivel A). Los metales utilizados fueron Cd, Cu, Cr, Ni, Pb y Zn; los mismos fueron aplicados al suelo en forma de sales solubles, y mezclados con el mismo en forma homogénea. La cantidad de sales aplicadas en el nivel M para alcanzar las concentraciones finales que se muestran en el Cuadro 2.2 fueron: 0,57 g de ácido crómico ( $H_2CrO_4$ ) por  $kg^{-1}$  suelo, 0,022 g de nitrato de cadmio ( $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ) por  $kg^{-1}$

suelo, 0,40 g cloruro de cobre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) por  $\text{kg}^{-1}$  de suelo, 0,32 g de cloruro de níquel ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) por  $\text{kg}^{-1}$  de suelo, 0,80 g de nitrato de plomo ( $\text{N}_2\text{O}_6\text{Pb}$ ) por  $\text{kg}^{-1}$  de suelo y 1,33 g de sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) por  $\text{kg}^{-1}$  de suelo. En el nivel A se aplicó el doble de las cantidades mencionadas anteriormente. La diferencia en las concentraciones de metal aplicadas se debió a que los metales estudiados tienen distinto grado de toxicidad para las plantas. Teniendo en cuenta lo indicado en el Capítulo I, en relación con la alta biodisponibilidad de las sales solubles, se apuntó a crear en el suelo utilizado, condiciones similares a situaciones reales. Para ello, luego de aplicar los metales en el suelo, se los sometió a ciclos de humedecimiento y secado durante un periodo de tres meses aproximadamente. Cada ciclo consistió en el humedecimiento de los suelos contaminados y el control sin contaminar hasta el punto de capacidad de campo y su posterior secado al aire por espacio de 15 días (Figura 2.1). Esta forma de incubación facilitó no sólo su homogeneización, sino su interacción con la matriz del suelo, a fin de lograr un nuevo equilibrio de los metales aplicados (Martínez & Motto, 2000).

**Cuadro 2.2** Niveles aproximados de metales a los que se llevó el suelo mediante el agregado de las sales correspondientes.

Metal	mg/kg	
	Nivel M	Nivel A
Cd	10	20
Cu	150	300
Cr	250	500
Ni	80	160
Pb	500	1000
Zn	300	600

En los distintos capítulos se trabajó con los 6 metales en conjunto y separados en 2 grupos: Cu, Pb y Zn, por un lado y Cd, Cr y Ni por el otro. Este agrupamiento de los metales estuvo basado en varios trabajos que mostraron agrupaciones de Cu, Pb y Zn en conjunto. Yoon y col. (2006) encontraron que los sitios urbanos con altas concentraciones de Pb tendían a presentar también altas concentraciones de Cu y Zn, lo cual podría indicar que los 3 metales provenían de fuentes similares de contaminación. Kabala y col. (2001) también observaron que estos metales estaban asociados en la vecindad de un área industrial. El segundo grupo se estructuró sobre la base de dos situaciones: i) Cr y Ni constituían un grupo de metales separado de los anteriores, en un estudio previo sobre contaminación de suelos de la ciudad de Buenos Aires y alrededores (Lavado y col. 1998) y ii) Cd suele estudiarse en asociación con el Zn (Chaney y col. 1994; Hart y col. 2002). Precisamente, en este caso, para estudiar una interacción no conocida previamente, este metal se agrupó separado del Zn y en conjunto con Cr y Ni. Además también se estudiaron los metales aplicados en forma individual.

Se utilizaron macetas de PVC de 2000  $\text{cm}^3$  perforadas en su base para asegurar buen drenaje. Las macetas con 2 Kg de suelo cada una, se ubicaron en invernáculo, a temperatura ambiente, en forma aleatorizada. Durante el transcurso de

los experimentos, el nivel de humedad de cada maceta se mantuvo a 80% de capacidad de campo mediante riego periódico con agua destilada. Una vez comenzados los experimentos, se aplicó mediante riego aproximadamente cada 15 días fertilizante comercial (15:15:15). Las macetas se rotaron periódicamente.

La especie vegetal estudiada corresponde al género *Pelargonium*. En el Anexo se observa que inicialmente se trabajó con tres especies del género *Pelargonium* y luego se concentraron los experimentos en la especie que resultó más tolerante a la presencia de los metales en el suelo. Las especies estudiadas inicialmente fueron: *Pelargonium peltatum* (*P. peltatum*), *Pelargonium hortorum* (*P. hortorum*) y *Pelargonium graveolens* (*P. graveolens*). Las 2 primeras especies se obtuvieron de viveros comerciales, mientras que *P. graveolens* fue multiplicada a partir de material procedente del jardín botánico de la FAUBA.

En todos los experimentos, aproximadamente 16 semanas luego del trasplante, las plantas fueron cosechadas, determinándose el peso total, peso de raíces, tallos, hojas y flores (con base en el peso seco) y las concentraciones de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en las fracciones de suelo y planta.

En planta se determinaron diversos índices explicados en detalle en los capítulos correspondientes. Entre ellos, el índice de tolerancia (TIN), la tasa de crecimiento relativo (TCR), la UR (tasa de absorción de metales), la relación raíz/parte aérea y el factor de bioconcentración (BCF).

Las muestras de suelo, se secaron al aire, se molieron y tamizaron por una malla de 2 mm. Los metales pesados totales se extrajeron mediante digestión con HCl-HNO<sub>3</sub> (McGrath & Cunliffe, 1985). La extracción total de los metales en estudio se efectuó con una digestión en caliente, con una mezcla de ácidos clorhídrico y nítrico concentrados (3:1), en una relación suelo/extractante de 1:10. Además en el suelo se determinaron metales disponibles (extracciones con DTPA y CaCl<sub>2</sub>) y se realizó el fraccionamiento secuencial y físico del mismo con metodologías que se explican en detalle en los capítulos correspondientes.

En planta se determinaron los metales totales, macro y micronutrientes mediante digestión ácida en bloque digestor. Para realizar las extracciones, el tejido vegetal fue secado en estufa durante 72 horas a 70°C, y luego molido. Posteriormente se tomaron muestras de 1 g del material vegetal, y se realizó una digestión húmeda con 15 ml de una mezcla ultrapura concentrada de HNO<sub>3</sub>/HClO<sub>4</sub> (3:1) (v:v) en bloque digestor. Las muestras fueron luego diluidas con 5 ml de HNO<sub>3</sub> al 0,2% (Jones y Case, 1990).

La cuantificación de los metales en suelos y en el material vegetal, se realizó por espectroscopía de emisión óptica por plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Todos los análisis fueron chequeados contra materiales de referencia estándar (NIST).



**Figura 2.1** Foto de los tambores utilizados para los ciclos de humedecimiento y secado de los suelos control, nivel M y nivel A

### CAPÍTULO III

## Extracción de metales de las fracciones químicas y físicas del suelo y acumulación en órganos de *P. hortorum*

### 3.1 Introducción

Las formas de metales que se encuentran en el suelo son las determinantes de la reactividad química de cada elemento y, específicamente, la disponibilidad para las plantas (Dudka y col. 1996; Adriano, 2001). Los metales están asociados con varios componentes del suelo en diferentes formas, y estas asociaciones determinan sus movilidades y disponibilidades (Ahumada y col. 1999). Por otro lado, la distribución de metales se estima que varía con las principales características físicas y químicas del suelo (Lacerda y col. 1993). Entre otros, los componentes que influyen la labilidad y la toma biológica de metales son el contenido de arcillas, pH, materia orgánica y óxidos de Fe y Mn (Ma & Rao, 1997; Karczewska y col. 1998).

Es conocido que en general la biodisponibilidad de los metales pesados decrece a medida que aumenta su tiempo de residencia en el suelo (McLaughlin, 2001). El cambio en las formas químicas de metales pesados y su conversión a formas menos solubles con el transcurso del tiempo han sido informados por varios autores (Lim y col. 2002; Lu y col. 2005; Rajaie y col. 2006). En condiciones naturales, generalmente sólo una pequeña fracción de metales traza esta presente en formas disponibles para las plantas (Kabata-Pendias & Pendias, 2000). Sólo en algunos suelos naturales desarrollados a partir de rocas ricas en estos metales, y en suelos contaminados, entre el 30 a 60 por ciento de los metales pueden estar en formas lábiles (Kuo y col. 1983; Singh y col. 1995; Karczewska y col. 1998). La disponibilidad también depende de otros factores, entre ellos las especies vegetales (Saverbeck & Hein, 1991; Davies, 1992; Smith, 1994a).

Se han propuesto diferentes metodologías a fin de evaluar el contenido de metales en los suelos, que pueden agruparse en: extracciones totales, extracciones de formas biodisponibles, extracciones secuenciales. La contaminación de los suelos con metales es usualmente valorada mediante determinaciones de la concentración total del metal. Tal es el caso de las diversas regulaciones existentes sobre contaminación de suelos (McLaughlin y col. 2000). El contenido total de elementos traza en los suelos se determina mediante digestiones con ácidos fuertes (Shuman 1979). Este análisis total permite distinguir exitosamente suelos contaminados con niveles elevados de metales de aquellos que contienen niveles considerados "normales". Sin embargo, la concentración total del metal presente en el suelo no se relaciona directamente con los efectos de toxicidad esperados para las especies vegetales sensibles, sino más bien una fracción del total estaría disponible para los seres vivos, la que se ha denominado como biodisponible (Kabata-Pendias & Pendias, 2000; Badilla y col. 2001, Ginocchio y col. 2002).

La determinación de formas biodisponibles involucra una única extracción, cuyo valor se correlaciona con la absorción vegetal. Se han propuesto una amplia variedad de extractantes, que se pueden agrupar en agentes complejantes, ácidos débiles ó diluidos y sales neutras (Haq y col 1980; Norvell, 1984). El valor obtenido se compara con un nivel de concentración considerado crítico, que es definido como la concentración que produce una disminución del 10 % de rendimiento. Una dificultad de esta técnica es que los agentes extraen no sólo las formas disponibles, sino también extraen parcialmente las fracciones de menor disponibilidad para las raíces. La cantidad extraída depende del extractante utilizado y de las características de los suelos.

Finalmente, en las últimas décadas se han desarrollado procedimientos secuenciales de extracción a fin de discriminar las diferentes fracciones de metales presentes en suelos. La identificación de las formas químicas en las cuales los metales son retenidos en el suelo es útil para predecir su movilidad potencial, su disponibilidad para las plantas y la cantidad de metal que pasa a través de la cadena alimentaria (Mbila y col. 2001). Los esquemas de fraccionamiento no han sido estandarizados y en la literatura se describen numerosos procesos que remueven elementos traza de distintos "pools" fisicoquímicos (Tessier y col. 1979; Shuman 1979). Las fracciones habitualmente estudiadas son: soluble e intercambiable, unida a materia orgánica, unida a carbonatos, unida a óxidos de hierro y manganeso, y remanente. Las formas solubles e intercambiables se consideran móviles y disponibles para las plantas (Li & Shuman, 1996), mientras que los metales incorporados dentro de enrejados cristalinos y arcillas son relativamente inactivos. Las otras formas (precipitados como carbonatos, ocluidos en Fe, Mn y óxidos de Al, o complejados con materia orgánica), pueden ser relativamente activos o firmemente unidos, dependiendo sobre todo de la combinación de propiedades físicas y químicas de cada suelo (Lu y col. 2005). El principal objetivo del uso de estos extractantes es establecer relaciones significativamente satisfactorias entre los niveles de elementos en las plantas y las fracciones químicamente extractables en los suelos (Tiller, 1989).

Las fracciones no son estables, varían a lo largo del tiempo, por influencia de aportes de distintos insumos en los suelos (Torri & Lavado, 2002). Sin embargo se han encontrado diferentes resultados, que se deben a que la especiación depende de las características del suelo y de los diferentes mecanismos de adsorción y precipitación predominantes en cada caso (Petruzzelli y col. 1994). Por ejemplo, varios autores reportaron que el Zn agregado a un suelo fue encontrado principalmente en la fracción residual y en la fracción integrante de la materia orgánica (Canet y col. 1997; Luo & Christie, 1998; Illera y col. 2000). En contraste, Walter & Cuevas (1999) observaron que el Zn se encontraba principalmente precipitado como carbonatos. Estos autores también determinaron una extremadamente baja concentración de Zn en la fracción intercambiable, debido al alto pH de los suelos, en concordancia con los resultados obtenidos por Illera y col. (2000) y Chaudhuri y col. (2003). Otros estudios informaron incrementos en el Zn intercambiable y/o Zn adsorbido a óxidos de Fe-Mn (Hseu y col. 2006).

Algunos autores (Giusti, 2001; Huang & Lin 2003) han encontrado además que la contaminación por metales pesados depende también de la composición mineral y el tamaño de las partículas de suelos y sedimentos. La composición granulométrica de los suelos tiene una gran importancia en la retención de los metales debido, fundamentalmente, a la capacidad de adsorción de las arcillas. En este sentido, la separación en tamaños de agregados (o partículas) ha sido ampliamente utilizada a fin de distinguir "pools" de diferente calidad de materia orgánica y nutrientes (Christensen, 1992; Agbenin & Tiessen, 1995). De acuerdo con Sutherland y col. (2000) las concentraciones de metales pesados se relacionan con el tamaño de partícula, aumentando a medida que disminuye el tamaño de las mismas. Para la mayor parte de los metales, las concentraciones más altas existen en sedimentos o suelos de grano fino, los cuales están compuestos principalmente de silicatos, óxidos, y los hidróxidos de Si, Fe y Al; niveles inferiores de metales pesados, por lo general se encuentran en sedimentos arenosos gruesos, compuestos principalmente de cuarzo, feldespatos, y otras sustancias (Song y col. 1999). Sin embargo, experimentos realizados con Cd y Pb mostraron que la sorción de estos elementos reflejó las diferencias en la mineralogía de las arcillas del suelo y CIC (Molisol>Ultisol>Oxisol), pero fue contraria a la cantidad de arcilla y al área superficial específica de estos tres suelos (Appel & Ma, 2002).

Por otro lado, la capacidad de absorción y la distribución de los metales dentro de las plantas varía entre especies. Angelova y col. (2004) encontraron que la acumulación de Pb, Cu, Zn y Cd en lino siguió el orden: raíces> tallos> hojas> flores; en cáñamo, en cambio, el orden fue: flores> raíces> tallos> hojas. En algodón la abundancia de Zn y Pb fue hojas> raíces> flores> tallos, diferente de la del Cu (hojas> raíces> tallos> flores). Una de las aplicaciones más importantes del fraccionamiento químico es la de estimar la biodisponibilidad de los metales para diferentes tejidos de las plantas; en este sentido algunas investigaciones encontraron correlaciones entre determinados elementos traza en las fracciones del suelo y los contenidos de dichos elementos en plantas. Por ejemplo, Hooda y col. (1997) informaron que las concentraciones de metales en plantas de trigo, zanahoria y espinaca correlacionaron bien con los tenores extraídos de la fracción soluble del suelo. Otros autores (Iyengar y col. 1981; LeClaire y col. 1984; Sims, 1986), encontraron que las formas intercambiables y unidas a materia orgánica representarían las formas disponibles para las plantas. Sin embargo en otros estudios, no se observó ninguna correlación y, por lo tanto, se aplicó un análisis de regresión múltiple entre las fracciones de metales en el suelo, el pH y la absorción por las plantas (Sims & Kline, 1991; Davies, 1992). Torry & Lavado (2009) trabajando con *Lolium perenne* L. en suelos enmendados con biosólidos concluyeron que las fracciones más disponibles obtenidas mediante extracción secuencial no fueron indicadoras de la disponibilidad de Cu y Zn para las plantas.

Finalmente, dos grupos contrastantes de plantas se distinguen sobre la base de su diferente habilidad para acumular metales: las plantas exclusoras, las cuales retienen los metales pesados en el sistema radical, excluyendo prácticamente la entrada de metales a parte aérea; por otro lado, las plantas hiperacumuladoras las cuales acumulan grandes cantidades de metales en la parte aérea sin sufrir daños aparentes en su metabolismo (Baker, 1981).

Los objetivos de este capítulo fueron investigar en que órgano de la especie *P. hortorum* se produce la mayor acumulación de los metales, y establecer cuales son las formas químicas y físicas del suelo a partir de las cuales esta especie extrae los metales. Las hipótesis planteadas fueron que la mayor acumulación se producirá en las raíces de las plantas, aunque los restantes órganos también acumularán cantidades importantes de metales; que la absorción de metales por parte de *P. hortorum* estará relacionada con las formas químicas más rápidamente disponibles en el suelo; y finalmente que dada la alta proporción de limo y arcilla en el suelo la absorción de metales por parte de *Pelargonium* estará relacionada con las fracciones finas (menores a 0,002mm) y medias (0,05-0,002).

### 3.2 Materiales y Métodos

Teniendo como base el experimento descrito en el Anexo, se desarrollaron otros dos experimentos en dos momentos diferentes con la especie *P. hortorum* (malvón). Se utilizaron los mismos niveles de contaminación, pero un experimento se realizó con Cu, Zn, Pb (experimento 1), y el otro con Cd, Cr, Ni (experimento 2).

#### 3.2.1 Determinación de los metales en raíces, tallos, hojas y flores

Después de la cosecha las plantas se lavaron con agua destilada y se secaron en una estufa a 70°C hasta peso constante determinándose los pesos secos de raíces, tallos y hojas y flores en cada planta. Luego, estos órganos se molieron a polvo fino, separadamente; a fin de determinar la concentración de metales en los diferentes

órganos con la técnica indicada en el capítulo II. Las concentraciones de metales en los órganos de *P. hortorum* fueron analizados mediante ICP-OES.

### 3.2.2 Fraccionamiento secuencial del suelo

Se determinó el contenido total de metal en el suelo mediante la técnica indicada en el capítulo II, y además se efectuó el fraccionamiento secuencial del mismo previo a la plantación. La partición de los metales se efectuó siguiendo la metodología de extracción secuencial de Stover y col. (1976) modificada por McGrath y Cegarra (1992), que utiliza 3 g de muestra seca y obtiene las fracciones indicadas en la Figura 3.1: I) soluble e intercambiables, II) unida a la materia orgánica, III) asociada a carbonatos y IV) residual. Los elementos de la fracción residual se calcularon como la diferencia entre el contenido total en el suelo y la suma de las fracciones extraídas (I + II + III). Todas las extracciones se realizaron en muestras duplicadas del mismo tratamiento, y los resultados medios fueron utilizados para el análisis posterior. En cada extracto se determinó la concentración de Cd, Cu, Cr, Ni, Pb y Zn, siguiendo la técnica indicada en el Capítulo II.

### 3.2.3 Fraccionamiento físico del suelo

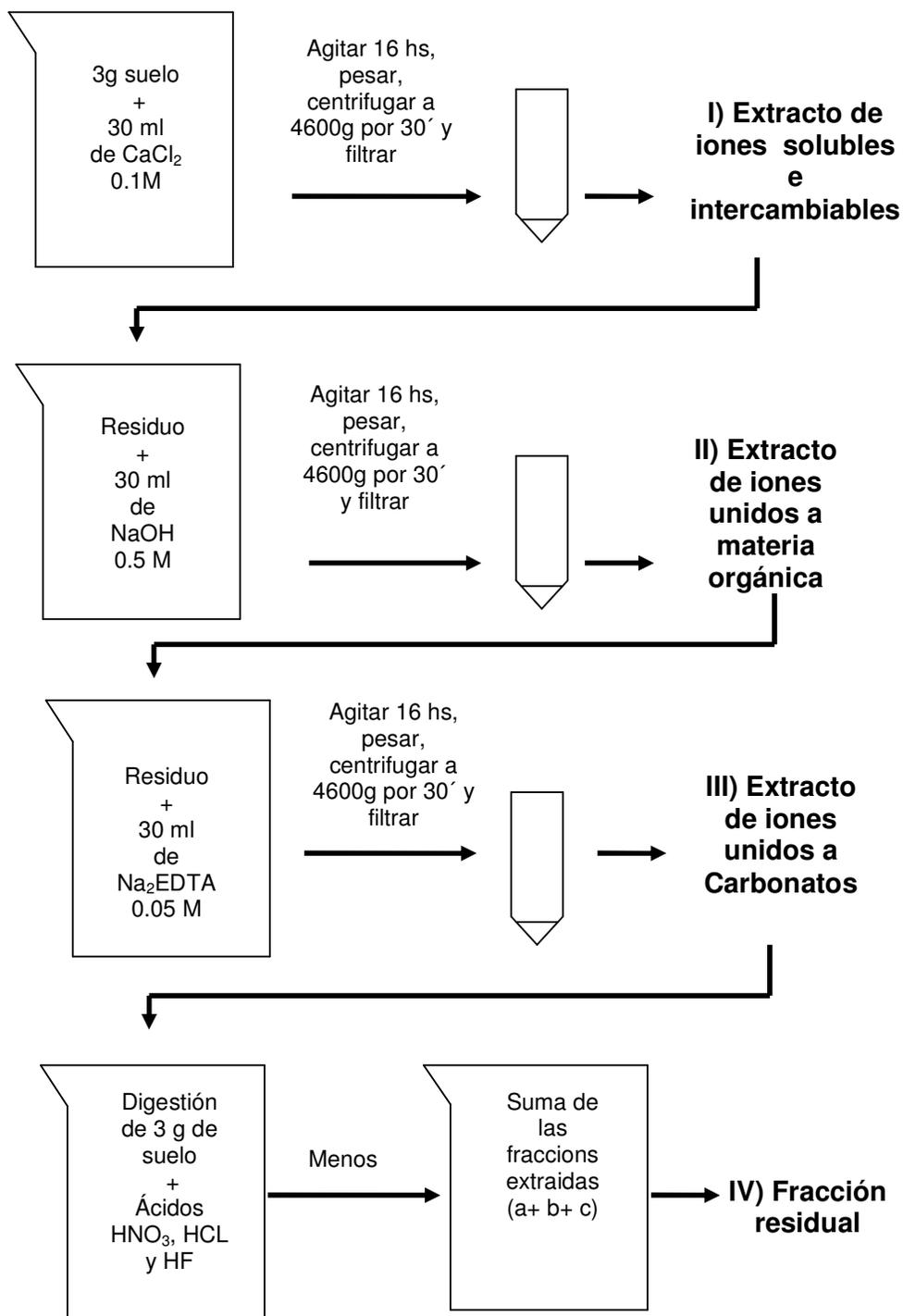
Las fracciones texturales del suelo se determinaron mezclando 50 g de suelo en un vaso de precipitado con 500 ml de agua, se sometió la mezcla a la acción de un dispersor de ultrasonido (21,5 Hz y 300 mA) durante 30 minutos. La fracción arena se determinó mediante tamizado en húmedo (0,53  $\mu\text{m}$ ) y las fracciones arcilla y limo se separaron por sedimentación siguiendo el método de la Pipeta (Gee & Bauder, 1986). Se secaron estas fracciones a baja temperatura y se determinaron en ellas las formas totales de los metales anteriormente mencionados (Ducarior y col. 1995; Quian y col. 1996) mediante ICP-OES.

### 3.2.4 Correlaciones entre la concentración de metales en los órganos de *P. hortorum* y la concentración en las fracciones químicas y físicas

La concentración total de metales en las plantas se correlacionó con las concentraciones de metales en las fracciones químicas y físicas del suelo a fin de determinar la o las fracciones de donde las raíces extrajeron los metales.

### 3.2.5 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 5 y 4 repeticiones por tratamiento (experimentos 1 y 2, respectivamente). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) previa comprobación de homogeneidad de varianzas (test de Bartlett,  $p < 0,05$ ). Cuando mediante ANOVA se identificó alguna diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) se realizó un test de comparaciones múltiples (Tukey). La relación entre la acumulación de metales en los tejidos de *P. hortorum* y la concentración de los mismos en las fracciones del suelo fueron evaluadas mediante análisis de correlación simple (coeficientes de correlación de Pearson) y Stepwise.

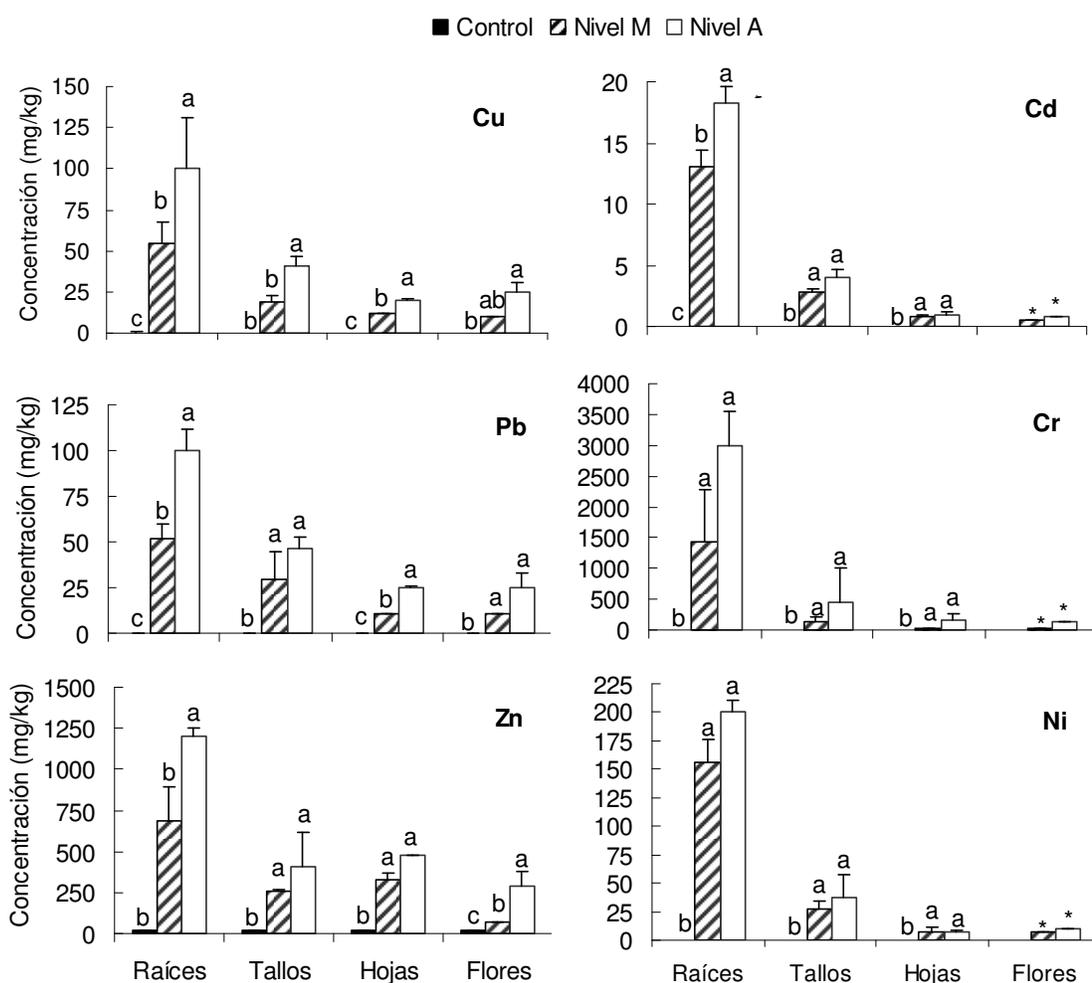


**Figura 3.1** Esquema del protocolo seguido para la extracción secuencial de metales.

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Determinación de los metales en raíces, tallos, hojas y flores

En la Figura 3.2 se observa que en líneas generales, la acumulación de metales fue máxima en las raíces, seguida por los tallos, hojas y, en menor medida, flores. Las concentraciones Cd, Cr, Ni, y Pb en todos los órganos del tratamiento control estuvieron por debajo del límite de detección del equipamiento del laboratorio utilizado. Cadmio, Cr y Ni fueron los elementos con menor translocación a hojas y flores, tanto en el tratamiento nivel M como alto. En general en tallos no se detectaron diferencias significativas entre la concentración media y alta para todos los metales, aunque la tendencia general es un aumento de concentración en este órgano a medida que aumenta el nivel de metales en el suelo. En la Figura 3.2 se muestran los resultados de concentración de metales en flores del experimento 2 en forma parcial, ya que dada la escasa producción de flores no pudo realizarse un análisis estadístico.



**Figura 3.2** Concentración de metales en raíces, tallos, hojas y flores experimentos 1 y 2. Los \* indican que no se pudo realizar el ANOVA por falta de repeticiones.

#### 3.3.2 Fraccionamiento secuencial del suelo

En el Cuadro 3.1 se observa que la concentración total de metales en los suelos enriquecidos se incrementó significativamente con respecto al nivel encontrado en el suelo control.

**Cuadro 3.1** Valores promedio de metales por tratamiento en el suelo control, nivel M y nivel A.

Tratam.	Concentración total de metales (mg/kg)					
	Cu	Pb	Zn	Cd	Cr	Ni
Control	27,3	22,5	37,7	2,6	24,7	14,2
Nivel M	198,2	650,1	414,2	8,6	428,1	107,5
Nivel A	509,3	1467,2	782,4	17,6	852,6	238,5

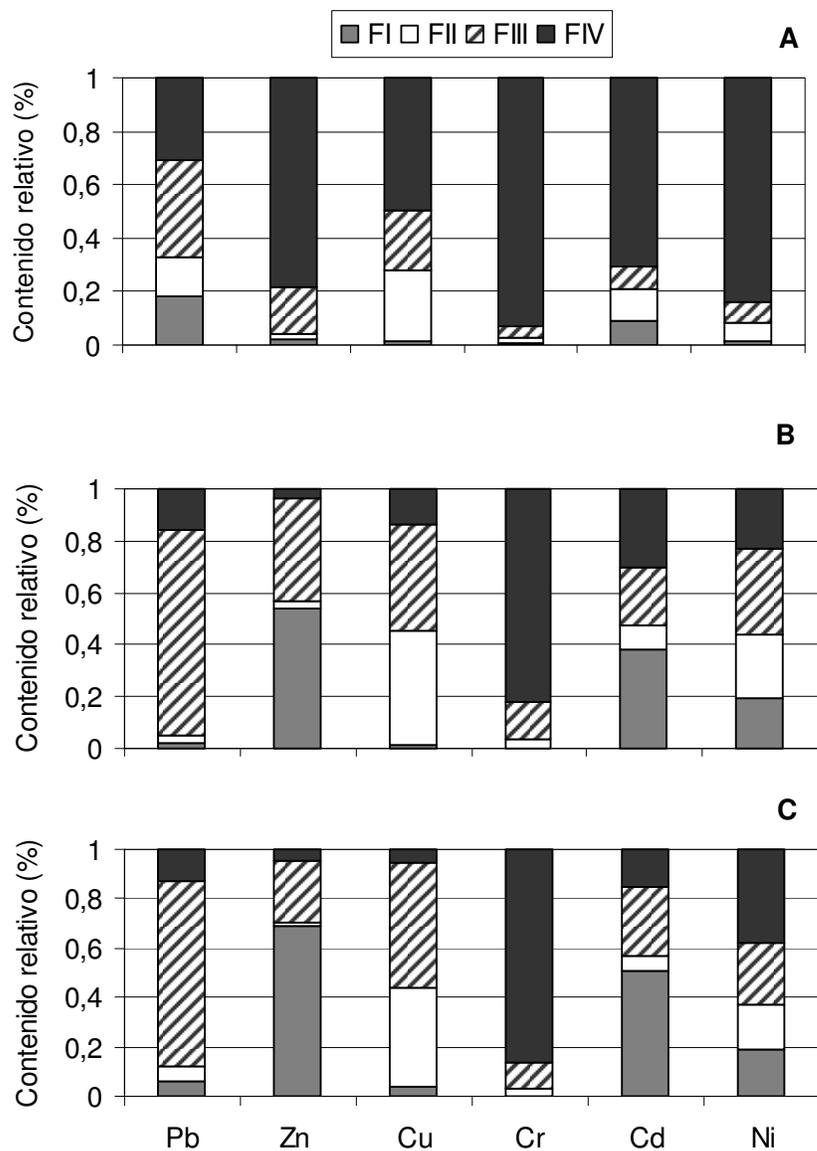
En el Cuadro 3.2 se muestra la partición secuencial de los metales en los suelos control, nivel M y nivel A respectivamente. Los resultados obtenidos muestran que el enriquecimiento del suelo con metales lleva a una redistribución de estos en las diferentes fracciones, incrementándose significativamente la concentración de ellos en todas las fracciones. Mientras que en el suelo control la fracción residual es la predominante para todos los metales estudiados, en los suelos a los que se aplicaron los metales se observa un incremento generalizado en las fracciones más disponibles con respecto a la fracción residual.

**Cuadro 3.2** Contenidos totales de metales del suelo control, nivel M y nivel A, extraído mediante el fraccionamiento secuencial del suelo. Valores promedio  $\pm$  desvío estándar.

Metal	Fracción	Concentración (mg/kg)		
		Control	Nivel M	Nivel A
Pb	I	4,1 $\pm$ 0,4	13,8 $\pm$ 0,3	94,0 $\pm$ 7,3
	II	3,4 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 2,3	94,4 $\pm$ 4,1
	III	8,2 $\pm$ 0,4	514,7 $\pm$ 3,6	1153,3 $\pm$ 151,8
	IV	6,9 $\pm$ 0,2	107,9 $\pm$ 5,5	201,4 $\pm$ 121,7
Zn	I	0,9 $\pm$ 0,0	223,0 $\pm$ 10,5	459,1 $\pm$ 7,7
	II	0,7 $\pm$ 0,1	11,1 $\pm$ 4,3	11,9 $\pm$ 1,7
	III	6,6 $\pm$ 0,2	163,9 $\pm$ 6,5	164,7 $\pm$ 9,6
	IV	29,5 $\pm$ 0,2	16,2 $\pm$ 12,8	37,7 $\pm$ 0,2
Cu	I	0,5 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,0	20,4 $\pm$ 0,3
	II	7,2 $\pm$ 0,1	87,7 $\pm$ 4,2	207,8 $\pm$ 1,4
	III	6,1 $\pm$ 0,1	81,1 $\pm$ 4,2	263,1 $\pm$ 1,4
	IV	13,5 $\pm$ 0,1	27,3 $\pm$ 0,1	27,3 $\pm$ 0,1
Cr	I	0,1 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,9
	II	0,6 $\pm$ 0,0	14,7 $\pm$ 0,3	25,4 $\pm$ 3,8
	III	1,1 $\pm$ 0,1	62,5 $\pm$ 2,9	86,6 $\pm$ 19,9
	IV	22,9 $\pm$ 0,1	349,7 $\pm$ 3,2	738,6 $\pm$ 23,9
Cd	I	0,2 $\pm$ 0,0	3,1 $\pm$ 0,2	9,1 $\pm$ 0,3
	II	0,3 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,1
	III	0,2 $\pm$ 0,0	1,9 $\pm$ 0,1	5,0 $\pm$ 0,3
	IV	1,8 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,1
Ni	I	0,2 $\pm$ 0,0	20,6 $\pm$ 2,1	45,6 $\pm$ 3,3
	II	0,9 $\pm$ 0,1	26,8 $\pm$ 1,0	42,7 $\pm$ 1,7
	III	1,1 $\pm$ 0,2	35,6 $\pm$ 2,0	59,1 $\pm$ 2,5
	IV	11,9 $\pm$ 0,3	24,4 $\pm$ 1,8	91,1 $\pm$ 5,7

FI: fracción soluble e intercambiable; FII: fracción unida a materia orgánica; FIII: fracción unida a carbonatos; FIV: fracción residual.

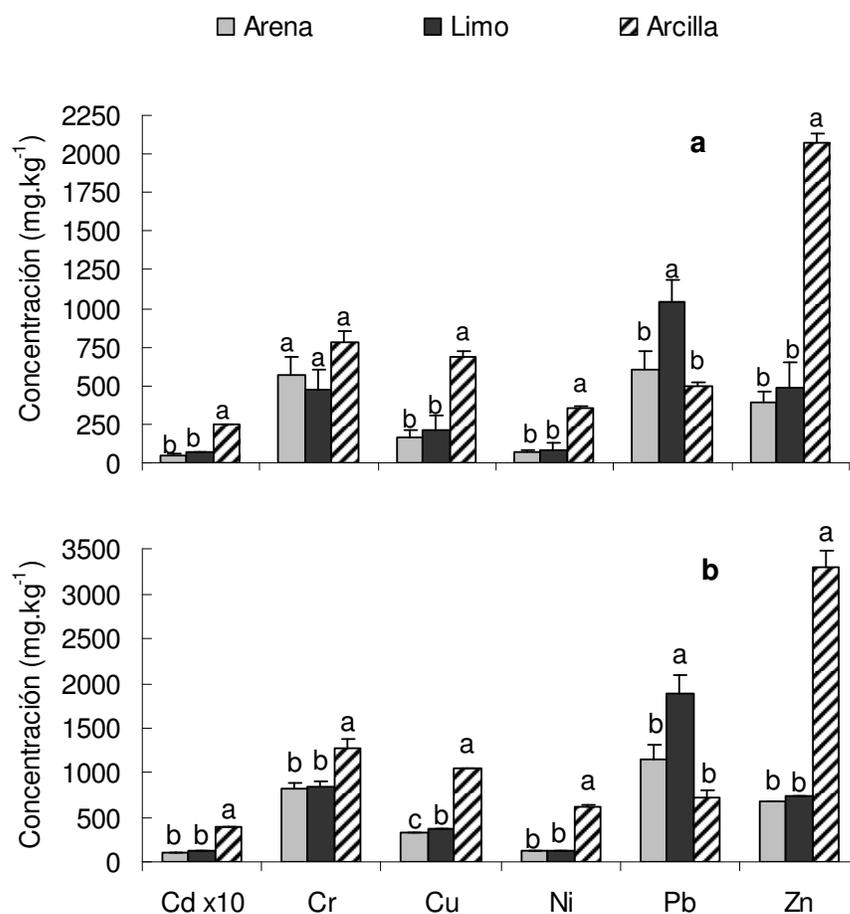
Cadmio, Zn y Ni fueron los elementos más lábiles, recuperados en la primera fase de extracción, mostrando que son potencialmente más biodisponibles; Pb y Cr fueron los metales menos lábiles, con un alto porcentaje asociado a las fracciones unida a carbonatos y residual, respectivamente. El cobre, en cambio, mostró un comportamiento intermedio presentando gran afinidad por las fracciones unida a materia orgánica y unida a carbonatos (Figura 3.3).



**Figura 3.3** Contenido relativo de metales (expresado como porcentaje respecto al total) en las cuatro fracciones del suelo control (A), nivel M (B) y nivel A (C). FI: fracción soluble e intercambiable; FII: fracción unida a materia orgánica; FIII: fracción unida a carbonatos; FIV: fracción residual.

### 3.3.3 Fraccionamiento físico del suelo

En la Figura 3.4 a y b se observa la distribución de los metales estudiados en las fracciones granulométricas de los suelos a los que se aplicaron los metales. Exceptuando al Pb, el cual se encontró adsorbido en mayor proporción a la fracción limo, los resultados muestran que, en general, los metales se asociaron principalmente a la fracción arcilla.



**Figura. 3.4** Concentración de metales en diferentes fracciones granulométricas en suelo nivel M (a) y nivel A (b). Valores promedio  $\pm$  desvío estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.4 Correlaciones entre la concentración de metales en los órganos de *P. hortorum* y la concentración en las fracciones químicas y físicas

Las correlaciones entre las concentraciones totales de metal en raíces, tallos y hojas de *P. hortorum* y las concentraciones de metales en las diferentes fracciones del suelo, expresadas como los coeficientes de correlación, se muestran en el Cuadro 3.3.

**Cuadro 3.3** Coeficientes de correlación de Pearson (r) para las relaciones entre el contenido de metales en los órganos de *P. hortorum* (mg.kg<sup>-1</sup>) y el contenido de metales en las fracciones del suelo. \*Significativo p < 0,05.

Metal	Organo	Fracción			
		FI	FII	FIII	FIV
Cu	Raiz	0,96*	0,90*	0,94*	0,53
	Tallos	0,93*	0,98*	0,97*	0,78
	Hojas	0,93*	0,99*	0,98*	0,83*
Zn	Raiz	0,95*	0,72	0,68	0,52
	Tallos	0,85*	0,80	0,85*	0,13
	Hojas	0,95*	0,95*	0,97*	0,15
Pb	Raiz	0,98*	0,98*	0,90*	0,71
	Tallos	0,79*	0,83*	0,93*	0,85*
	Hojas	0,93*	0,96*	0,98*	0,82*
Cr	Raiz	0,76	0,87*	0,80	0,93*
	Tallos	0,75	0,85*	0,75	0,94*
	Hojas	0,60	0,72	0,52	0,83*
Cd	Raiz	0,91*	0,98*	0,91*	0,95*
	Tallos	0,89*	0,99*	0,92*	0,94*
	Hojas	0,79	0,96*	0,83*	0,96*
Ni	Raiz	0,97*	0,99*	0,99*	0,88*
	Tallos	0,87*	0,86*	0,87*	0,66
	Hojas	0,73*	0,85*	0,86*	0,55

FI: fracción soluble e intercambiable; FII: fracción unida a materia orgánica; FIII: fracción unida a carbonatos; FIV: fracción residual.

De acuerdo con el cuadro, en general la absorción de los metales por las plantas estuvo asociada principalmente a la fracciones soluble e intercambiable, unida a materia orgánica y unida a carbonatos ( $P < 0,05$ ) y en menor medida con la fracción residual. En este último caso se encuentran Cu y Ni en hojas, Pb en tallos y hojas y Cd y Cr en los tres órganos. A diferencia de los demás elementos, Cr presentó una correlación estadísticamente significativa especialmente con la fracción residual y con la fracción unida a materia orgánica.

En el Cuadro 3.4 se muestran las ecuaciones de regresión entre el contenido de metales en los órganos de *P. hortorum* y el contenido de metales en las fracciones físicas del suelo

**Cuadro 3.4** Ecuaciones de regresión generadas mediante Stepwise para las relaciones entre el contenido de metales en los órganos de *P. hortorum* ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) y el contenido de metales en las fracciones físicas del suelo.

Metal	Ecuación de regresión	$r^2$
Cu	Curaíz = $-865,7 + 4,8 \times \text{arena}$	0,92
	Cuhojas = $-5,8 + 0,02 \times \text{arcilla}$	0,98
Zn	Znraíz = $-6493,8 + 17,1 \times \text{arena}$	0,96
	Znhojas = $-102,6 + 0,1 \times \text{arcilla}$	0,94
Pb	Pbraíz = $-385,5 + 0,4 \times \text{limo}$	0,95
	Pbtallo = $-385,6 + 0,9 \times \text{arena}$	0,95
	Pbhojas = $-7,14 + 0,02 \times \text{limo}$	0,93
Cr	Crraíz = $-9144,9 + 9,7 \times \text{arcilla} + 5,2 \times \text{limo}$	0,99
	Crtallo = $-1054,9 + 1,5 \times \text{arcilla}$	0,96
Cd	Cdraíz = $4,8 + 0,3 \times \text{arcilla}$	0,91
Ni	Niraíz = $9,4 + 0,3 \times \text{arcilla}$	0,95

En el Cuadro 3.4 observamos que casi todos los metales estudiados mostraron una correlación significativa y positiva con el contenido de metales en las fracciones finas del suelo (arcillas y limos); las excepciones fueron Cu y Zn en raíces, y Pb en tallos los cuales correlacionaron con el contenido de metales en la fracción arena.

### 3.4 Discusión

Como tendencia general *P. hortorum* mostró una acumulación creciente en sus órganos a medida que se incremento la dosis de metales en el suelo, aunque donde se registro la mayor acumulación fue en la raíz. Esto coincide con lo encontrado por otros autores (Krishnaraj y col. 2000; Dan y col. 2002) en una especie de geranio aromático. De acuerdo con Singh y col. (2004), esta mayor acumulación de metales en las raíces puede atribuirse a la formación de complejos entre ellos y grupos sulfhidrilo a nivel celular, lo cual resulta en menor transporte de los metales pesados a las partes aéreas.

Por otro lado, la acumulación de metales en la parte aérea varió con el metal específico en investigación; de este modo, Cu, Pb y Zn en tallos, hojas y flores mostraron una relación lineal aún a altas concentraciones de metales en suelo, indicando la mayor translocación de estos elementos a las partes aéreas de las plantas; nuestros resultados contrastan con los encontrados por MacFarlane y col. (2003) quienes observaron una acumulación lineal de Cu en hojas sólo a bajas concentraciones. Por otro lado, normalmente se considera que el Pb se acumula principalmente en las raíces de las plantas, siendo muy baja la fracción transportada hacia la parte aérea (Blaylock y col. 1997); sin embargo nuestros datos sugieren que a altas concentraciones de Pb en el suelo, el transporte hacia la parte aérea es elevado. En los casos de Cd, Cr y Ni, las grandes diferencias entre la concentración en raíces y

la concentración en las hojas indican una importante restricción del transporte interno de los metales de las raíces hacia los tallos y hojas verdes, indicando que el proceso de acumulación fue metabólicamente controlado (Schat y col. 2000; Marmiroli y col. 2005). Dicha inmovilización de metales en las células de la raíz, se relaciona con una estrategia de exclusión indicando que esta especie se comporta como excluyente de esos elementos. De acuerdo con Baker (1981) muchas especies toleran las elevadas concentraciones de metales en el suelo porque restringen su absorción y/o translocación hacia las hojas. Esto les permite mantener concentraciones constantes y relativamente bajas en la biomasa aérea independientemente de la concentración metálica del suelo en un intervalo amplio. En la actualidad, los criterios utilizados para considerar a una planta como hiperacumuladora varían según el metal; de acuerdo con Reeves & Baker (2000) las especies hiperacumuladoras son aquellas capaces de acumular en partes aéreas  $>100 \text{ mg.kg}^{-1}$  Cd,  $>1000 \text{ mg.kg}^{-1}$  Ni, Pb, Cu y Cr, o  $>10000 \text{ mg.kg}^{-1}$  de Zn cuando crecen en suelos ricos en metales. Si bien en los suelos con metales todos los metales alcanzaron concentraciones tóxicas en los tejidos de las plantas (Kabata Pendias & Pendias, 2000), nuestros datos indican las concentraciones de Pb, Cu, Cd y Ni en *P. hortorum* fueron menores que estos valores; las excepciones fueron las concentraciones de Cr en raíces en el nivel M ( $1433,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) y alto ( $7573,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) respectivamente, y las concentraciones de Zn en raíces en el nivel A ( $5004,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ ).

El grado de asociación de los metales con las diferentes formas geoquímicas depende ampliamente de propiedades físico-químicas de los suelos, tales como pH, carbonato de calcio y contenido de materia orgánica (Kabata-Pendias & Pendias, 2000). En el suelo control, sólo una pequeña proporción de los metales se encontró en forma intercambiable, en concordancia con lo observado por otros autores en suelos locales (Lavado & Porcelli, 2000; Torri & Lavado, 2002). Además, las concentraciones totales en este suelo estuvieron en relación con suelos no contaminados de la zona (Lavado y col. 2004). En cambio, en los tratamientos en los que el suelo fue enriquecido e incubado durante 3 meses, se observó una redistribución de los metales hacia la fracción intercambiable o hacia la fracción asociada a carbonatos, confirmando que los metales aportados, al menos en el corto plazo, adoptan formas no residuales. Esta mayor disponibilidad se debe en gran medida al origen antrópico de estos elementos, ya que los metales de este origen suelen estar potencialmente más biodisponibles que los de origen natural (Chlopecka y col. 1996; Adriano, 2001). Es sabido que la mayor parte de los metales de origen antrópico son adsorbidos a la superficie del suelo en formas intercambiables o rápidamente solubles y luego lentamente con el tiempo son transformados a formas estables (McLaughlin, 2001). En el caso específico del Pb, su redistribución hacia la fracción asociada a carbonatos coincide con lo reportado por otros autores en suelos enmendados con biosólidos (Walter & Cuevas 1999). Cadmio, Zn y en menor proporción Ni se encontraron mayormente en formas solubles; en el caso específico del Cd esto contrasta con lo observado por otros autores (Mann & Ritchie, 1994; Tang y col. 2006) quienes encontraron que el Cd soluble en agua es convertido en compuestos relativamente poco solubles en cortos periodos de tiempo. La mayor afinidad de Cu con la materia orgánica en comparación con el resto de los metales, hizo que el mismo se encuentre unido en alta proporción a la fracción unida a materia orgánica. De acuerdo a Alloway (1995), una de las asociaciones materia orgánica-metal más estrecha se da con el Cu, lo que redundaría en una fuerte disminución de su potencial tóxico, por lo que la disponibilidad y movilidad del mismo estaría controlada por la degradación de la materia orgánica (Quia y col. 2003). Finalmente, una importante fracción del Cr aplicado fue encontrada en el suelo en forma insoluble. Dado que el Cr (III) tiene un radio iónico ( $0,64 \times 10^{-10} \text{ m}$ ) similar al del Mg ( $0,65 \times 10^{-10} \text{ m}$ ) y al del Fe trivalente ( $0,65 \times 10^{-10} \text{ m}$ ), es posible que el Cr (III) pueda sustituir fácilmente al Mg en los

silicatos y al  $\text{Fe}^{3+}$  en los óxidos de hierro (Han y col. 2001); esto explicaría en parte la elevada proporción de Cr en la fracción residual.

Como fue mencionado anteriormente, las fracciones soluble en agua e intercambiable (y a veces la fracción orgánica) son las que se consideran generalmente como las formas relativamente disponibles para las plantas (Petruzzeli, 1989; Shuman, 1991). Nuestros resultados muestran que en general la concentración de metales en los órganos estuvo relacionada principalmente con las fracciones solubles e intercambiables, unida a materia orgánica, unida a carbonatos y en menor medida con la fracción residual. Sin embargo, de acuerdo con Navas & Lindhorfer (2003) los metales asociados a la fracción residual no se espera que sean liberados al ambiente en el corto plazo. Por ejemplo, Bhattacharyya y col. (2005) en plantas de arroz enmendadas con residuos sólidos urbanos encontraron que las fracciones unida a carbonatos y residual no correlacionaron con los contenidos de Cr en paja y granos de arroz. De acuerdo con McGrath y col. (1997), la biodisponibilidad de los metales para una especie vegetal depende de la propia naturaleza del elemento, de múltiples factores del suelo, así como de la propia especie vegetal que se estudia, ya que las plantas pueden modificar las condiciones de la rizosfera de distintas formas, accediendo a fracciones de metales potencialmente poco disponibles. Por ejemplo, es conocido que las raíces desempeñan un papel importante en la movilización de nutrientes minerales y metales ya que excretan compuestos orgánicos de bajo peso molecular, los cuales presentan propiedades complejantes o quelantes de iones (Hinsinger, 1998). De acuerdo con Krishnamurti y col. (1997) los exudados orgánicos de las raíces pueden movilizar los metales adsorbidos a la solución del suelo. En este experimento no se examinaron exudados radicales. Por otro lado, cabe señalar que las relaciones encontradas se limitaron a regresiones lineales no contemplándose la posibilidad de algún otro tipo de ajuste.

De acuerdo con Pickering (1980) las arcillas son uno de los mayores componentes reactivos del suelo y son capaces de adsorber iones de metales pesados. Nuestros resultados coinciden en que las arcillas juegan un rol importante como reservorio de metales pesados en este suelo, ya que casi todos los elementos se encontraron asociados mayoritariamente a las mismas. La excepción fue el Pb, el cual se encontró en alta proporción adsorbido a la fracción limo. Este comportamiento podría atribuirse a la presencia de algunos componentes reactivos como por ejemplo materia orgánica y sesquióxidos en esa fracción. En concordancia con los resultados de la tesis, Varrica y col. (2003) encontraron que Pb presentó una significativa acumulación en las partículas gruesas del suelo. En general, el enriquecimiento antropogénico en metales en materiales de granulometría fina se debe a su gran superficie específica y a las fuertes propiedades adsorptivas de los minerales de arcilla (Forstner y col. 1982). En base a los datos de textura del suelo (ver capítulo 2) y los datos de metales en cada fracción, junto con las ecuaciones generadas mediante el procedimiento Stepwise fue posible inferir la importancia relativa de cada fracción con respecto a su contribución a la disponibilidad de los metales. Las fracciones limo y arcilla mostraron los mayores contenidos totales de metales, y buenas correlaciones con lo absorbido por las planta; sin embargo, en lo que respecta a la contribución relativa de diferentes tamaños de partículas, la fracción limo es una de las principales responsables de la disponibilidad de los metales, principalmente debido a su abundancia en el suelo. Nuestros resultados concuerdan con lo planteado por Herut y col. (1993) y Szefer y col. (1995) quienes sugirieron que las fracciones granulométricas finas pueden encontrarse altamente enriquecidas en varios metales traza mientras que las fracciones de granulometría gruesa muestran menor afinidad hacia la acumulación de los mismos; de este modo, los suelos arenosos contienen menores concentraciones de metales pesados que los suelos arcillosos (Ross, 1994).

### 3.5 Conclusiones

Nuestros resultados muestran que *P. hortorum* acumuló una alta proporción de los metales en raíces, siendo menor la acumulación en tallos, hojas y flores (tallos > hojas > flores). Los resultados obtenidos mediante extracción secuencial mostraron que en el suelo control la fracción residual fue la predominante para todos los metales estudiados, mientras que en los suelos contaminados se observó un incremento en las fracciones más disponibles, confirmando que los metales aportados, al menos en el corto plazo, adoptaron formas no residuales. La absorción de casi todos los metales estuvo principalmente relacionada con fracciones soluble e intercambiable, unida a materia orgánica, y unida a carbonatos, siendo éstas fracciones las que más contribuyeron a la biodisponibilidad de estos metales. El Cr y otros metales registraron una correlación significativa con la fracción residual. Estos últimos resultados contrastan con los que presenta la literatura y pueden ser objeto de varias interpretaciones (errores de la metodología de secuenciación, procesos de adsorción y/o cristalización incompletos, la influencia de exudados radicales etc). Finalmente, excepto en el caso de Pb, los resultados del fraccionamiento físico del suelo mostraron que los metales se asociaron principalmente a la fracción arcilla, siendo las fracciones finas (arcilla+limos) las que más contribuyeron a la absorción.

*La hipótesis 3.1 es aceptada ya que en base a los resultados obtenidos, la mayor acumulación se produjo en las raíces de las plantas seguidas por tallos, hojas y flores. La hipótesis 3.2 es rechazada; la absorción de los metales parecería estar relacionada con fracciones soluble e intercambiable, unida a materia orgánica, y unida a carbonatos, siendo éstas las fracciones que más contribuyeron a la biodisponibilidad de estos metales y solo en el caso específico del Cr y otros metales también con la fracción residual. La hipótesis 3.3 es aceptada ya que la absorción de casi todos los metales por parte del cultivo correlacionó con los contenidos totales encontrados en las fracciones finas (menores a 0,002mm) y medias (0,05-0,002).*

## CAPÍTULO IV

### Extracción de metales desde la rizosfera y el volumen del suelo e interacciones entre metales

#### 4.1 Introducción

La importancia de la rizosfera en la nutrición de las plantas es conocida desde comienzos del siglo XX (Hinsinger y col. 2003). La rizosfera, definida como la masa de suelo que rodea las raíces (Merckx y col. 1986a; Hinsinger, 1998), presenta características muy diferentes a las que posee el volumen de suelo. Esto es el resultado de la acción de raíces y la colonización por microorganismos (Chairidchai & Ritchie, 1992). Entre la rizosfera y el volumen de suelo, existen diferencias en los valores de pH (Marschner & Römheld, 1983), en las concentraciones de Ca, Mg y K y en las concentraciones de compuestos solubles orgánicos (Merckx y col. 1986b).

La rizosfera, como consecuencia de la actividad radical, regula la acidez del suelo (Hinsinger, 2003). Este mecanismo de acidificación de la rizosfera, es debido a la extrusión de protones desde las raíces (Crowley y col. 1991). A fin de mantener la neutralidad eléctrica, las raíces liberan protones cuando toman más cationes que aniones, y toman protones cuando sucede lo contrario (Hinsinger y col. 2003). Por lo tanto, las raíces son responsables de cambios sustanciales en el pH de la rizosfera, como resultado de las tasas de absorción diferencial de cationes y aniones (Haynes, 1990). Por otro lado, algunos microorganismos pueden excretar compuestos orgánicos los cuales incrementan la biodisponibilidad y facilitan la absorción radical de metales esenciales, como Fe (Crowley y col. 1991) o tóxicos como Cd (Salt y col. 1995). Los microorganismos del suelo pueden influenciar directamente la solubilidad de los metales por alteración de sus propiedades químicas. Por ejemplo, se demostró que una raza de *Pseudomonas maltophilia* puede reducir la movilidad y toxicidad del Cr (VI) (tóxico y móvil) a Cr (III) (menos tóxico e inmóvil), minimizando también la disponibilidad de otros iones como  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  (Blake y col. 1993).

La rizosfera también tiene una influencia substancial sobre la disponibilidad o la solubilidad de nutrientes como el fósforo, así como sobre la disponibilidad de metales pesados (Marschner y col. 1986). Las plantas han desarrollado mecanismos especializados que incrementan la concentración de iones metálicos en la solución del suelo, por ejemplo, alterando el ambiente de la rizosfera, como se comentó previamente, y estimulando la desorción de iones desde la fase sólida del suelo hacia la solución. Varios estudios indicarían que existe una mayor concentración de las formas disponibles de metales pesados en la rizosfera con respecto al volumen de suelo; por ejemplo, Keller & Roemer (2001) y Wang y col. (2002) encontraron que existe una mayor concentración de Cr, Ni, Zn, Cu, Pb y Cd intercambiable y unido a carbonatos en la rizosfera respecto al volumen de suelo. Por otro lado, algunas plantas pueden regular la solubilidad de los metales en la rizosfera mediante el exudado de varios de compuestos orgánicos a partir de las raíces; de este modo, los exudados radicales complejan los iones metálicos manteniéndolos disponibles en solución desde donde son tomados por las raíces (Römheld & Marschner, 1986). Por ejemplo, a partir de las investigaciones de Takagi y col. (1984) se conoce que muchas especies de gramíneas exudan compuestos orgánicos conocidos como sideróforos, capaces de aumentar la disponibilidad de Fe y otros elementos en el suelo y su absorción por las raíces. Además, se ha demostrado que algunas especies de plantas toleran metales en la rizosfera, mediante un mecanismo que involucra la exudación de los ácidos cítrico y málico (Larsen y col. 1998). Estos ácidos orgánicos quelan  $\text{Al}^{3+}$ , el cual es altamente fitotóxico, formando con él un complejo significativamente menos tóxico (Ma y col. 2001; Pineros y col. 2002).

Por otro lado, es conocido que cuando una planta es expuesta a más de un metal pesado, pueden ocurrir interacciones entre los mismos tanto en la superficie de la raíz, afectando su absorción, como dentro de la planta, afectando su translocación y toxicidad (Pahlsson, 1989). Al presente, se han desarrollado varios modelos con el fin de predecir teóricamente el efecto interactivo esperado de los metales. Uno de estos modelos se basa en la teoría de probabilidades (Tsiridis y col. 2006). Si tomamos  $P_1$  como la tasa de inhibición causada por cierta concentración del metal 1 y  $P_2$  la tasa de inhibición causada por cierta concentración del metal 2, entonces la tasa de inhibición aditiva esperada teóricamente, cuando las mismas concentraciones de los 2 metales son aplicadas juntas, estará dada por la siguiente ecuación:

$$P(E) = P_1 + P_2 - \frac{P_1 \cdot P_2}{100} \quad (1)$$

Se plantea que cuando los valores observados sean mayores o menores que los teóricamente predichos, se consideran efectos sinérgicos y antagónicos respectivamente (Tsiridis y col. 2006).

Básicamente, cuando dos o más elementos coexisten en el suelo, la absorción de los mismos por parte de la planta está sujeta a efectos antagónicos, aditivos o sinérgicos que ejercen unos sobre otros (Ernst & Nelissen, 2000). Por ejemplo, Cd, Cu, Pb y Zn muestran una amplia gama de interacciones; Algunas de estas interacciones son antagónicas (Zn con Cu y Cd), mientras que otras son sinérgicas (Cd y Zn en la superficie de la raíz, Pb con Cd dentro de la planta) (Kabata-Pendias & Pendias, 2000). Varios estudios han mostrado interacciones entre la acumulación de Cd y Zn y en la mayor parte de los casos se reportaron efectos antagónicos (McLaughlin & Singh, 1999). Ramos y col (2002) estudiaron las interacciones entre Cd y varios micronutrientes en plantas de lechuga (*Lactuca Sp*) creciendo en solución nutritiva suplementada con Cd; ellos encontraron que las plantas creciendo en hidroponía incrementaron la acumulación de Mn en sus partes aéreas, pero redujeron la acumulación de Cu en comparación con las plantas control. Lorenz y col. (1997), trabajando con plantas de arveja en suelos con larga historia de contaminación por metales, observaron que las concentraciones de Cd en planta correlacionaron mejor con la concentración de Cd en la solución de la rizosfera. La absorción de Zn, en cambio, pareció ser afectada además por otros factores, incluyendo la diferente solubilidad del Zn en los suelos estudiados y, posiblemente, la habilidad de las plantas para controlar la absorción de Zn. Sin embargo, en este estudio, no hubo efectos aparentes de interacciones de los iones en solución (Ca, K, Mg, Mn, Cd) sobre la absorción de Zn.

Finalmente, la concentración de metales en la solución del suelo es un factor importante que regula la absorción de nutrientes y metales pesados por las plantas (Smith, 1994b; Cances y col. 2003). La determinación de metales biodisponibles permite una mejor predicción general del riesgo de absorción de metales por las plantas y su movilidad en el sistema (Pueyo y col. 2004). Se ha comprobado que soluciones de sales no tamponantes, como  $\text{CaCl}_2$ , (Eriksson, 1990) correlacionan directamente con la absorción por las plantas (Novozamsky y col. 1993; Hooda y col. 1997) y dan una aproximación del metal en solución, más el metal fácilmente intercambiable. En particular, el  $\text{CaCl}_2$ , no interfiere con el pH natural del suelo, es no destructivo para la mayor parte de los minerales del mismo, y provee cationes que se intercambian con el metal testeado (Andrewes y col. 1996; Houba y col. 1996).

Los objetivos del capítulo fueron evaluar la relación entre los metales acumulados en plantas de *Pelargonium sp* y los metales provenientes de la rizosfera o

del volumen de suelo, y además evaluar la diferencia en la absorción de cada elemento solo o en conjunto con otros. Las hipótesis fueron que la absorción de metales se vincula principalmente con la rizosfera, aunque el aporte del volumen del suelo varía según el elemento que se considere, y que la diferencia o similitud en la absorción entre los elementos solos o en conjunto con otros se relaciona con relaciones antagónicas/sinérgicas entre los mismos.

## 4.2 Materiales y métodos

Se realizó un nuevo experimento con la especie *P. hortorum* (malvón). En este experimento previo al agregado de los metales se le añadió un 20% de arena al suelo control a fin de mejorar la porosidad y asegurar la infiltración del agua. Los metales utilizados fueron Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn y los tratamientos con metales consistieron en diferentes combinaciones de los mismos: aplicación individual (un metal), ternaria (tres metales) y múltiple (6 metales). La aplicación en forma ternaria y múltiple de los metales se realizó al nivel M y nivel A, con los mismos niveles utilizados en los capítulos previos; en el caso de la aplicación individual, se utilizó el nivel A únicamente (Cuadro 4.1). El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con 13 tratamientos. Los tratamientos se numeraron del 0 al 12, correspondiendo T0 el tratamiento control y T12 el tratamiento Zn, nivel A. En el caso de la aplicación individual, los tratamientos contaron con 2 repeticiones. En el caso de la aplicación múltiple de metales se trabajó con 3 repeticiones por tratamiento.

### Tratamientos

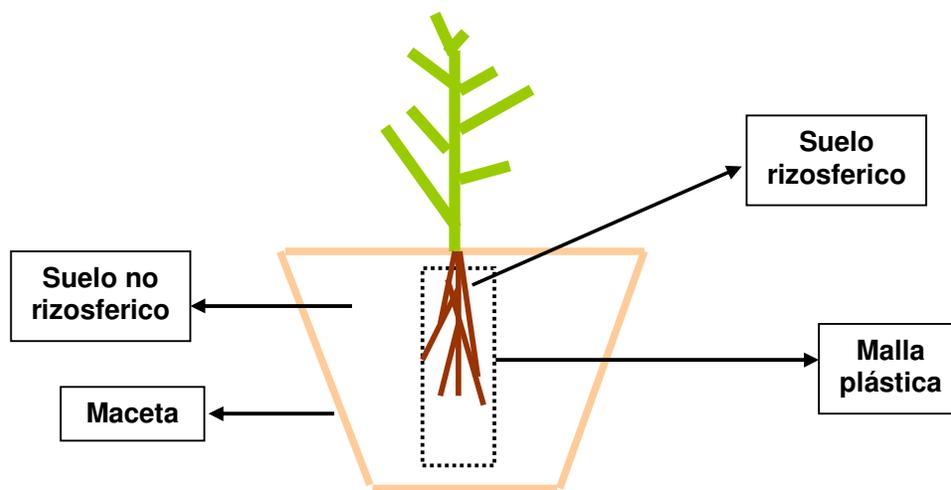
<b>T0</b> = control, no contaminado;	<b>T7</b> = Cd nivel A;
<b>T1</b> = 6 metales nivel M;	<b>T8</b> = Cr nivel A;
<b>T2</b> = 6 metales nivel A;	<b>T9</b> = Cu nivel A;
<b>T3</b> = 3 metales (Cu, Pb, Zn) nivel M;	<b>T10</b> = Pb nivel A;
<b>T4</b> = 3 metales (Cu, Pb, Zn) nivel A;	<b>T11</b> = Ni nivel A;
<b>T5</b> = 3 metales (Cr, Cd, Ni) nivel M;	<b>T12</b> = Zn nivel A;
<b>T6</b> = 3 metales (Cr, Cd, Ni) nivel A;	

**Cuadro 4.1** Concentración de metales por tratamiento luego del agregado de las sales solubles. Promedio  $\pm$  desvío estándar.

Tratamientos	Metales totales por tratamiento (mg/kg)					
	Cd	Cr	Cu	Pb	Ni	Zn
T0	1,1 $\pm$ 0,0*	9,9 $\pm$ 1,3*	10,8 $\pm$ 0,1*	26,9 $\pm$ 2,5*	6,3 $\pm$ 1,3*	35,9 $\pm$ 0,1*
T1	9,4 $\pm$ 0,4	355,2 $\pm$ 65,2	153,7 $\pm$ 26,0	537,2 $\pm$ 5,1	82,5 $\pm$ 18,4	438,0 $\pm$ 102,1
T2	15,2 $\pm$ 3,9	643,5 $\pm$ 151,6	271,6 $\pm$ 45,6	860 $\pm$ 199,2	138,5 $\pm$ 44,3	737,6 $\pm$ 230,9
T3			176,4 $\pm$ 22,3	580,9 $\pm$ 50,8		470,5 $\pm$ 64,8
T4			292,2 $\pm$ 40,7	961,7 $\pm$ 105,6		806,0 $\pm$ 27,6
T5	9,1 $\pm$ 0,1	326,2 $\pm$ 53,0			87,9 $\pm$ 6,9	
T6	21,9 $\pm$ 0,7	747,9 $\pm$ 53,5			164,4 $\pm$ 2,5	
T7-12	16,1 $\pm$ 0,0	580,4 $\pm$ 100,4	316,3 $\pm$ 12,2	1129,0 $\pm$ 131,3	140,8 $\pm$ 7,6	714,7 $\pm$ 107,2

\*Concentración original del suelo control

Para el crecimiento de las plantas se utilizaron “Rizopots”, basados en el trabajo de Silva Gonzaga y col. (2006). Cada “Rizopot” consistió en la maceta de 16 cm de alto x 14,5 cm de diámetro y una malla plástica (1mmx1mm) de 10 cm de alto x 7,5 cm de diámetro colocada en el centro, que separó el suelo rizosférico del no rizosférico (Figuras 4.1 y 4.2). De este modo, el crecimiento de la raíz quedó limitado al compartimiento central (500 g de suelo). En cada “Rizopot” fueron transplantadas plantas de tamaño homogéneo que crecieron en invernáculo por aproximadamente 120 días. Durante este periodo, las plantas fueron regadas a fin de mantenerlas a 80% de capacidad de campo.



**Figura 4.1** Esquema del “Rizopot”.



**Figura 4.2** Fotos del “Rizopot”.

#### 4.2.1 Determinación de peso seco por órgano y por tratamiento

Las plantas fueron lavadas después de la cosecha y secadas, tal como se indica en el capítulo II; luego se determinó el peso seco total por planta, peso seco aéreo (tallo, hojas y flores) y radical.

#### 4.2.2 Determinación de pH, CE y metales disponibles en el SR y SNR

Luego de la cosecha, se tomaron muestras del suelo rizosférico (SR) y del volumen de suelo o suelo no rizosférico (SNR). Se definió como SR a aquel que se encontraba dentro de la malla plástica luego de cosechadas las plantas, y el mismo fue tamizado a fin de separar restos de raíces que puedan haber quedado durante la cosecha. En el SR y SNR se evaluó pH y CE (relación 1:2,5 suelo/agua) con la técnica indicada en el capítulo II. Por otro lado en ambos suelos se evaluaron metales solubles, para lo cual se aplicó el método del cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) (Novozamski y col. 1993). Luego de agitar 3 g de suelo en 30 ml de solución 0,1 M de  $\text{CaCl}_2$  en agitador mecánico durante 16 hs a temperatura ambiente, los extractos fueron separados del residuo sólido por centrifugación a 4600xg durante 30 minutos. En dichos extractos se determinaron los seis metales por ICP-OES.

#### 4.2.3 Concentración de metales en raíces, tallos, hojas y flores de *P.hortorum* y correlaciones

La concentración de metales por órgano se realizó previo molido de las muestras por medio de la técnica explicada en el capítulo II. Además se realizó un análisis de correlación simple a fin de evaluar la relación entre disponibilidad de metales en ambos suelos y absorción por las plantas.

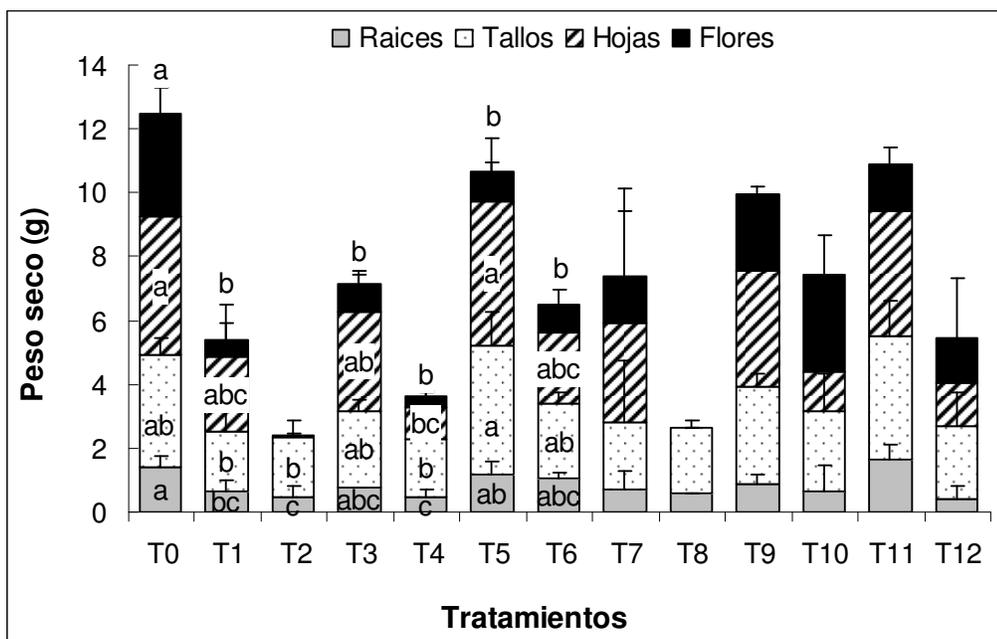
#### 4.2.4 Análisis estadístico

Los datos de peso seco se analizaron a través de ANOVA de una vía y las diferencias entre medias se compararon a través del test de Tukey ( $p < 0,05$ ). Se omitieron en el ANOVA los datos de las aplicaciones individuales de metales dada la variabilidad presentada y la muerte prematura de algunas plantas (una planta del tratamiento T7 y una del tratamiento T8); por este motivo sólo se presentan tendencias. Cuando los datos no se distribuyeron normalmente, se realizaron transformaciones logarítmicas. El análisis estadístico de los datos correspondientes al suelo se realizó utilizando el programa SAS versión 8.2. Se utilizó el procedimiento PROC MIXED para análisis de varianza univariado a fin de determinar los efectos de la rizosfera, pH y CE sobre la disponibilidad de los metales. Se analizó la significancia de los factores principales (tratamientos y suelos) y sus interacciones. En el caso de no determinarse una interacción significativa se realizó un análisis de efectos simples. Los datos de concentración de metales en planta fueron sometidos a ANOVA de una vía, previa transformación logarítmica, y las comparaciones entre medias fueron realizadas utilizando el Test de Tukey ( $p < 0,05$ ). Finalmente, se realizó un análisis de correlación simple empleando el coeficiente de correlación de Pearson a fin de evaluar la relación entre disponibilidad de metales en los suelos y la absorción de metales por las plantas.

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Determinación de peso seco por órgano y por tratamiento

En la Figura 4.3 se puede observar que el peso seco de raíces, tallos, hojas y flores a cosecha fue significativamente influenciado por algunos tratamientos; la exposición a varios de los metales causó una disminución significativa en la biomasa aérea, resultando especialmente afectados el peso seco de hojas y flores.



**Figura 4.3** Peso seco promedio  $\pm$  desvío estándar de raíces, tallos, hojas y flores. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos  $p \leq 0,05$ . En el caso de contaminación simple solo se muestran tendencias.

Para el caso de los metales aplicados en forma individual, el peso aéreo y radical (Figura 4.3) fueron menores al control para los tratamientos T7, T8 y T12, siendo especialmente afectados en el caso de Cr (T8) la producción de hojas y flores; en el caso de la contaminación ternaria y múltiple el peso aéreo y radical fueron menores al control en los tratamientos T1, T2, T3, y T4, resultando muy afectada la producción de hojas flores en el T2. Cabe destacar que las aplicaciones múltiples y ternarias resultaron en menor producción de flores respecto a la aplicación individual.

#### 4.3.2 Determinación de pH, CE y metales disponibles en el SR y SNR

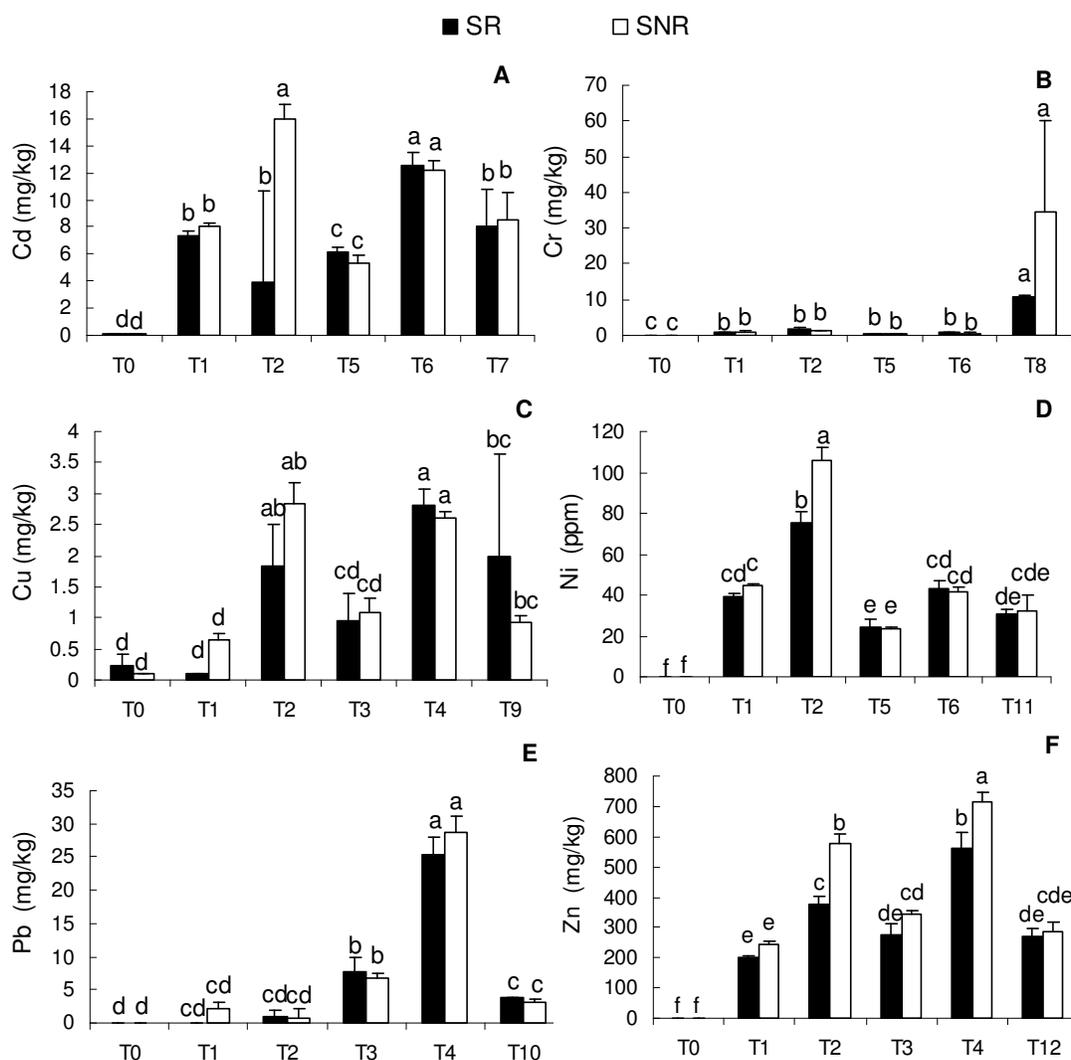
El Cuadro 4.2 muestra la variación del pH y conductividad eléctrica (CE) del suelo por tratamiento, luego de la cosecha de las plantas. El pH del SR varió entre 4,50 y 7,00, mientras que el del suelo SNR varió entre 4,60 y 6,70, con diferencias de 0,1-0,5 unidades de pH. Se registro una interacción significativa entre el factor tratamiento y el factor suelo en los tratamientos T1, T2, T5 y T12, pero sólo en el T5 el pH fue menor en el SR con respecto al SNR. Por otro lado, la CE de de varios de los tratamientos fue superior a la CE del tratamiento control. Los valores variaron entre 0,2 a 1,1 dS / m para el suelo SR y 0,4 a 3,2 dS / m para el suelo NR. Se registro una interacción significativa entre el factor tratamiento y el factor suelo en los tratamientos

en los casos de los tratamientos T1, T2 y T4 siendo los valores de CE significativamente más bajos en el suelo SR en comparación con el suelo SNR.

**Cuadro 4.2** pH y CE del SR y SNR en función de los tratamientos. Valores promedio  $\pm$  desvío estándar. Los \* indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Tratam.	pH		CE (ds.m-1)	
	SR	SNR	SR	SNR
T0	5,4 $\pm$ 0,14	5,8 $\pm$ 0,19	0,2 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,06
T1	5,2* $\pm$ 0,01	4,7* $\pm$ 0,04	0,3* $\pm$ 0,00	1,9* $\pm$ 0,45
T2	5,1* $\pm$ 0,35	4,6* $\pm$ 0,07	0,4* $\pm$ 0,10	3,2* $\pm$ 1,06
T3	4,5 $\pm$ 0,06	4,6 $\pm$ 0,10	1,1 $\pm$ 0,03	1,7 $\pm$ 0,36
T4	4,6 $\pm$ 0,17	4,6 $\pm$ 0,14	0,7* $\pm$ 0,18	3,2* $\pm$ 0,49
T5	5,5* $\pm$ 0,18	5,8* $\pm$ 0,12	0,4 $\pm$ 0,15	0,3 $\pm$ 0,13
T6	5,7 $\pm$ 0,15	5,6 $\pm$ 0,37	0,4 $\pm$ 0,12	0,8 $\pm$ 0,58
T7	6,6 $\pm$ 0,06	6,5 $\pm$ 0,01	0,3 $\pm$ 0,03	0,4 $\pm$ 0,05
T8	7,0 $\pm$ 0,15	6,7 $\pm$ 0,04	0,2 $\pm$ 0,09	0,8 $\pm$ 0,41
T9	6,5 $\pm$ 0,02	6,3 $\pm$ 0,08	0,9 $\pm$ 0,22	0,9 $\pm$ 0,01
T10	6,3 $\pm$ 0,08	6,4 $\pm$ 0,08	0,9 $\pm$ 0,39	1,3 $\pm$ 0,14
T11	6,6 $\pm$ 0,04	6,6 $\pm$ 0,04	0,7 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,10
T12	6,6* $\pm$ 0,02	6,2* $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,15	1,1 $\pm$ 0,34

En la Figura 4.4 se observan las concentraciones de los metales disponibles  $\text{CaCl}_2$  en el suelo SR y SNR. Para algunos tratamientos (T2 y T4), la concentración de metales pesados disponibles en el SR fue significativamente diferente al SNR. Se registró una interacción significativa entre los factores tratamiento y suelo para Cd y Ni en el T2 y para Zn en los tratamientos 2 y 4 (Figura 4.3, A, D y F), lo que indicaría que la disponibilidad varió en función de estos 2 factores. En consecuencia, no fue posible evaluar los factores "tratamiento" y "suelo" por separado. Por otro lado, el factor tratamiento fue significativo para Cr, Cu y Pb, mientras que factor suelo no resultó estadísticamente significativo (Figura 4.3 B, C y E). Cabe señalar que si bien se registraron cambios en el pH de algunos de los tratamientos luego del agregado de los metales, estos cambios no correlacionaron con la disponibilidad de los elementos, excepto en el caso de Cr, el cual mostró una relación positiva estadísticamente significativa ( $y = 4,3 - 22,1$  con un  $r^2 = 0,65$ ).

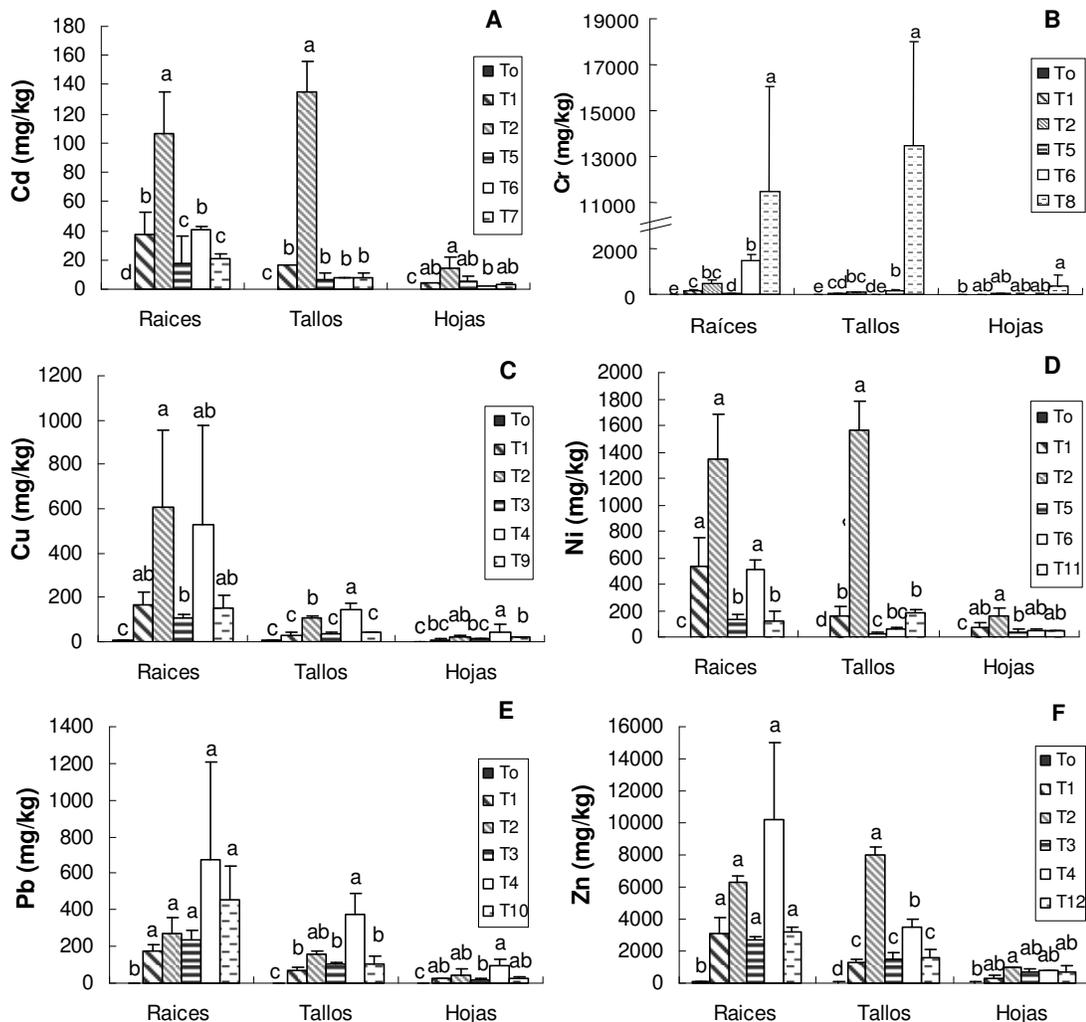


**Figura 4.4** Concentraciones de metales disponibles (extracción con  $\text{CaCl}_2$ ) en el suelo SR y SNR en función de los tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos  $p \leq 0,05$ .

#### 4.3.3 Concentración de metales en raíces, tallos, hojas y flores de *P. hortorum* y correlaciones

La Figura 4.5 presenta la distribución de metales los metales en los tejidos del *P. hortorum*. Las concentraciones de Cd, Ni y Pb (Figura 3 A, D y E) en el tratamiento T0, estuvieron por debajo del límite de detección en planta. Las concentraciones de todos los metales en los demás tratamientos fueron mayores en el nivel A en comparación al nivel M, sobre todo para raíces y tallos. La concentración de metales a cosecha varió en función de los tratamientos y el órgano específico considerado; en general, las mayores concentraciones fueron observadas en las raíces, intermedias en los tallos, inferiores en hojas (Figura 4.5) y aún más bajas en las flores (Cuadro 4.3). Este orden general de acumulación varió para Cd, Ni y Zn en el tratamiento 2; estos elementos presentaron gran translocación a tallos, llegando a alcanzar valores algo

superiores a los de la raíz. En los tratamientos donde se aplicó los metales en forma individual, se registró menor acumulación en planta; la excepción fue Cr, ya que su concentración en planta fue mayor cuando se añadió sólo.



**Figura 4.5** Distribución de metales en raíces, tallos y hojas de *P. hortorum* en función de los tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos  $p \leq 0,05$ .

En el Cuadro 4.3 se observa de la concentración de metales en flores de *P. hortorum* a cosecha y en el Cuadro 4.4 la concentración de metales en flores y hojas senescentes. En general la concentración de metales en flores a cosecha (Cuadro 4.3) fue relativamente baja comparada con los otros órganos, presentándose los valores más altos en el caso de Zn para todos los tratamientos. Solo se muestran tendencias ya que no pudo realizarse el análisis estadístico de estos datos debido a la falta de repeticiones en algunos tratamientos.

**Cuadro 4.3** Concentración  $\pm$  desvió estándar de la concentración de metales en flores de *P. hortorum* a cosecha; los \* indican sin repetición. ND (no detectado) y LD (valor del límite de detección).

Tratam.	Concentración de metales en flores (mg/kg)					
	Cd	Cr	Cu	Pb	Ni	Zn
T0	ND (LD=0,2)	2,8 $\pm$ 0,4	4,0 $\pm$ 0,6	ND (LD=4,0)	ND (LD=2,0)	57,6 $\pm$ 6,0
T1	3,2 $\pm$ 2,3	16,3 $\pm$ 16,5	14,6 $\pm$ 7,6	15,3 $\pm$ 15,1	70,6 $\pm$ 27,4	283,7 $\pm$ 146,5
T2	sin flores	sin flores	sin flores	sin flores	sin flores	sin flores
T3			11,3 $\pm$ 1,1	16,6 $\pm$ 2,9		677,6 $\pm$ 48,8
T4			53,8*	76,9*		869,2*
T5	4,7 $\pm$ 2,7	16,5 $\pm$ 11,4			31,7 $\pm$ 16,9	
T6	1,2 $\pm$ 0,5	20,6 $\pm$ 8,9			19,8 $\pm$ 5,8	
T7-12	3,4*	sin flores	17,3 $\pm$ 13,3	12,7 $\pm$ 4,3	43,5 $\pm$ 16,1	423,1 $\pm$ 7,7

**Cuadro 4.4** Concentración  $\pm$  desvió estándar de metales en flores y hojas senescentes de *P. hortorum*; los \* indican sin repetición. ND (no detectado) y LD (valor del límite de detección).

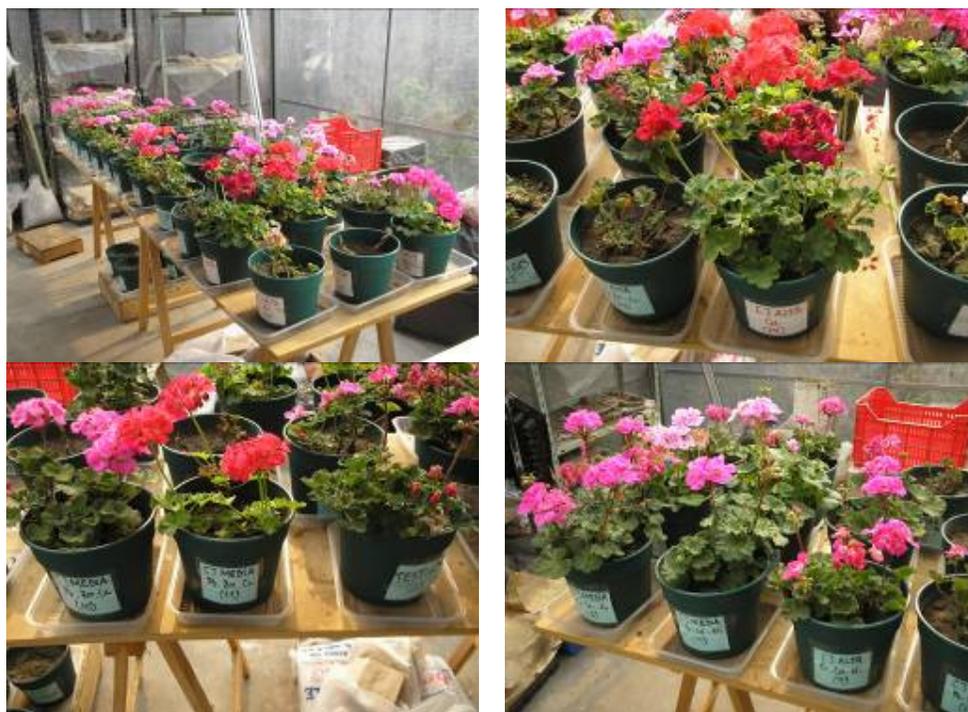
Tratam.	Organo	Concentración de metales en hojas y flores senescentes (mg/kg)					
		Cd	Cr	Cu	Pb	Ni	Zn
T0	Hojas	ND (LD=0,2)	6,0 $\pm$ 2,1	5,9 $\pm$ 0,2	ND (LD=4,0)	3,0 $\pm$ 1,0	18,3 $\pm$ 7,2
	Flores	0.4	8.6	4,9 $\pm$ 1,5	ND (LD=4,0)	4,5 $\pm$ 1,8	29,8 $\pm$ 9,5
T1	Hojas	8,7 $\pm$ 7,2	50,2 $\pm$ 22,6	19,2 $\pm$ 10,6	52,8 $\pm$ 28,3	225,1 $\pm$ 220,3	647,0 $\pm$ 618,0
	Flores	4,1 $\pm$ 4,9	18,8 $\pm$ 5,1	10,3 $\pm$ 2,2	15,1 $\pm$ 10,3	66,0 $\pm$ 52,3	363,4 $\pm$ 389,7
T2	Hojas	43,4 $\pm$ 32,4	72,8 $\pm$ 34,2	39,7 $\pm$ 22,7	84,5 $\pm$ 47,7	490,7 $\pm$ 392,8	2952,9 $\pm$ 2347,1
	Flores	ND (LD=0,2)	ND (LD=2,0)	ND (LD=2,0)	ND (LD=4,0)	68.8	68.8
T3	Hojas			12,6 $\pm$ 5,4	24,9 $\pm$ 14,2		888,7 $\pm$ 914,7
	Flores			13 $\pm$ 14,4	48.1		432.7
T4	Hojas			26,1 $\pm$ 20,0	81,3 $\pm$ 45,9		1340,0 $\pm$ 622,7
	Flores			23,3 $\pm$ 16,9	36,4 $\pm$ 39,5		616,0 $\pm$ 556,4
T5	Hojas	1,4 $\pm$ 0,9	36,4 $\pm$ 34,3			22,3 $\pm$ 6,0	
	Flores	1.8	7,5 $\pm$ 1,4			8,4 $\pm$ 2,5	
T6	Hojas	2,6 $\pm$ 1,1	97,9 $\pm$ 72,3			28,1 $\pm$ 16,4	
	Flores	1.0	13,8 $\pm$ 12,7			14,9 $\pm$ 2,5	
T7-T12	Hojas	1,7 $\pm$ 1,2	374,1 $\pm$ 488,5	15,4 $\pm$ 7,9	52,7 $\pm$ 40,8	11,5 $\pm$ 2,4	352,7 $\pm$ 249,1
	Flores	sin flores	sin flores	12,7 $\pm$ 0,9	11,9 $\pm$ 2,6	10,7 $\pm$ 1,9	154,5 $\pm$ 11,7

Las hojas y flores senescentes recolectadas durante el transcurso del experimento (Cuadro 4.4) mostraron una gran variabilidad entre tratamientos; si bien no se realizó el ANOVA de estos datos, debido a la variabilidad y falta de repeticiones para algunos tratamientos, aparentemente no presentaron diferencias con las concentraciones en hojas verdes, registradas a cosecha.

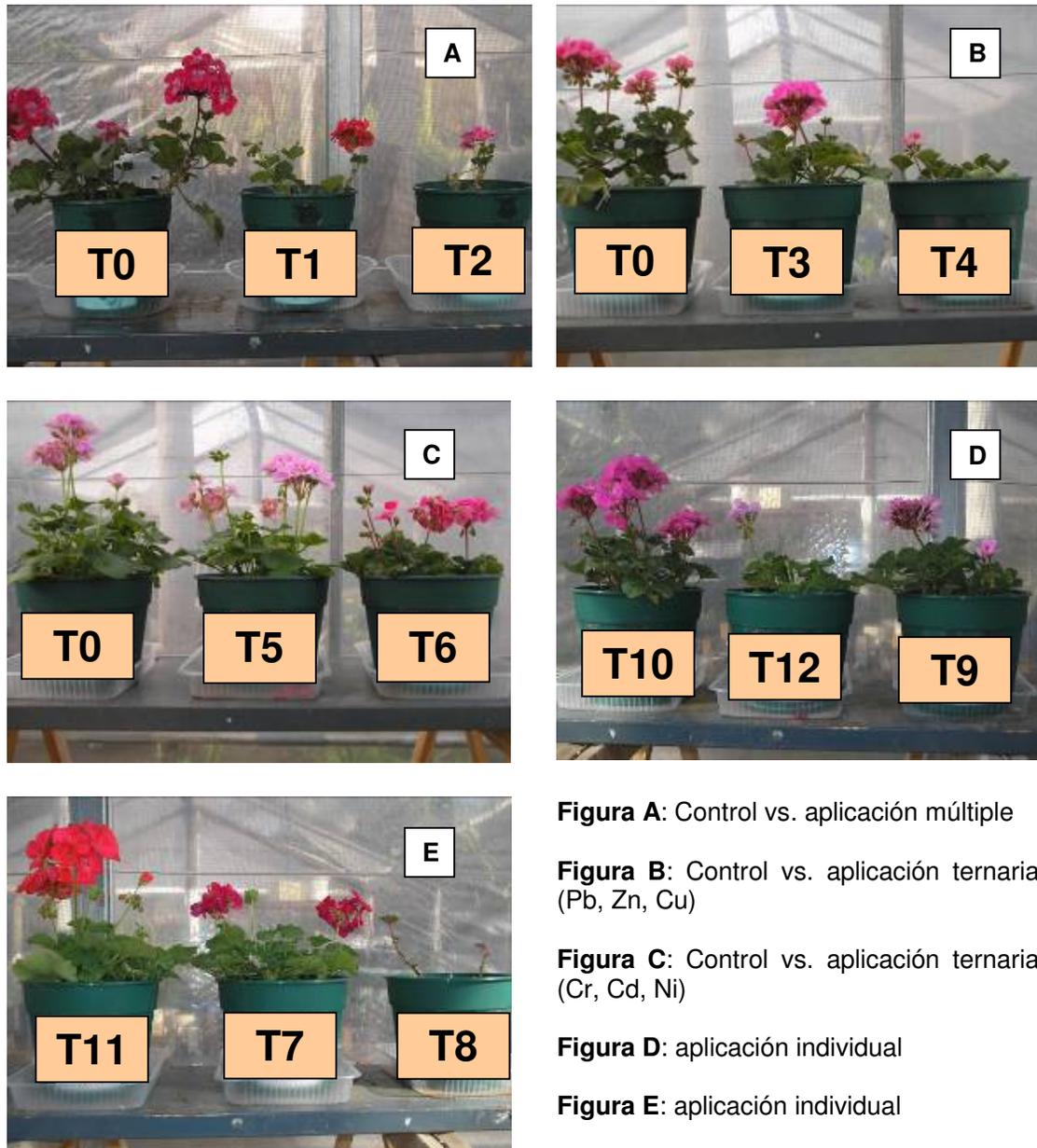
En el Cuadro 4.5 se presentan los coeficientes de correlación entre los metales disponibles y la acumulación en raíces, tallos y hojas del *P. hortorum*. En general, se obtuvieron correlaciones significativas y una estrecha relación con el contenido de metales en ambos suelos. Las excepciones fueron Cd, Cu y Zn en algunos órganos de la planta.

**Cuadro 4.5** Coeficientes de correlación de Pearson de las relaciones entre los metales disponibles en SR y SNR y lo acumulado en las plantas. Los \* indican correlación significativa.

	Metales disponibles extraídos con $\text{CaCl}_2$											
	SR						SNR					
	Cd	Cr	Cu	Pb	Ni	Zn	Cd	Cr	Cu	Pb	Ni	Zn
<b>Raíces</b>	0,08	0,98*	0,71	0,83*	0,94*	0,96*	0,89*	0,99*	0,97*	0,81*	0,97*	0,96*
<b>Tallos</b>	-0,23	0,99*	0,32	0,91*	0,83*	0,6	0,72	0,99*	-0,19	0,91*	0,92*	0,74
<b>Hojas</b>	-0,15	0,99*	0,89*	0,88*	0,95*	0,83*	0,73	0,99*	0,77*	0,90*	0,99*	0,81



**Figura 4.6** Fotos generales del experimento completo.



**Figura A:** Control vs. aplicación múltiple

**Figura B:** Control vs. aplicación ternaria (Pb, Zn, Cu)

**Figura C:** Control vs. aplicación ternaria (Cr, Cd, Ni)

**Figura D:** aplicación individual

**Figura E:** aplicación individual

**Foto 4.7** Fotos de los diferentes tratamientos.

#### 4.4 Discusión

Es conocido que un exceso de metales pesados en el medio ambiente puede afectar negativamente el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas (Brun y col. 2003; Kim y col. 2003; Ryser & Sauder, 2006). Nuestros resultados presentados en el Capítulo III reafirman esa indicación. En este capítulo, los resultados obtenidos también muestran que el peso de raíces, tallos, hojas y flores a cosecha fueron significativamente menores al control en varios de los tratamientos. Se registraron, sin embargo, para varios tratamientos efectos sinérgicos como antagónicos sobre el crecimiento de la plantas. En este sentido, Cr se comportó como el más tóxico de los metales cuando se aplicó en forma individual; el mismo es conocido por los daños que causa en raíces (Zou y col. 2006) y membranas, induciendo clorosis, necrosis y retraso en el crecimiento de las plantas (Sharma y col. 2003). En contraste, Ni se comportó como el elemento menos tóxico presentando valores de peso seco semejantes al control; este resultado difiere de lo informado por otros autores, ya que el Ni produce síntomas como retraso del crecimiento, clorosis de las hojas (Seregin & Kozhevnikova, 2006) y disminución del número de flores y frutos (Balaguer y col. 1998). Excepto en el caso de Cr, las aplicaciones múltiples de metales mostraron un efecto sinérgico respecto al agregado individual de los mismos, reduciendo significativamente el crecimiento de las plantas. Esto concuerda con resultados de Symeonidis & Karataglis (1992) quienes encontraron que la aplicación simultánea de Pb, Cd y Zn ejerció un efecto sinérgico, reduciendo significativamente el crecimiento de raíces de *Holcus lanatus* L. Los tratamientos T1 y T3 ejercieron efectos semejantes en el crecimiento, no mostrando interacción entre metales. En cambio, los tratamientos T5 y T6 mostraron menor inhibición del crecimiento en combinación que cuando se aplicó el más tóxico de los metales (Cr) sólo. El hecho anterior sugiere que el efecto tóxico del metal más fitotóxico (Cr) es atenuado en presencia de Cd y Ni; es decir, existiría un efecto antagónico en el que la toxicidad es reducida.

Nuestros resultados muestran que en general el pH de la rizosfera no varió significativamente respecto al pH del SNR; incluso en algunos tratamientos el pH del SNR fue más ácido que el del SR, lo que sugiere que la acidificación de la rizosfera, no operó en la disponibilidad de los metales. De acuerdo con Bravin y col. (2009 a y b) el aumento en el pH del suelo alrededor de las raíces, actuaría reduciendo la disponibilidad de elementos traza tóxicos, y sería una manera de reducir la exposición de las plantas a los mismos. En este sentido, otros autores (Bernal & McGrath, 1994; Bernal y col. 1994), sugirieron que el mecanismo de solubilización de metales en plantas hiperacumuladoras no involucra la acidificación de la rizosfera. La conductividad eléctrica, la cual es una medida de las sales disueltas, fue significativamente menor en el SR para los tratamientos T1, T2 y T4 con respecto al SNR. Este resultado podría ser resultado de la absorción por parte de las raíces de los aniones de las sales de los metales pesados (fenómeno no cuantificado en la presente tesis). En ningún caso los valores de CE excedieron los límites de tolerancia en plantas sensibles.

De acuerdo con Krishnamurti (1999) la biodisponibilidad de los metales pesados depende de su concentración en la solución edáfica y de la liberación de los iones de metales de la fase sólida del suelo. Las plantas fueron capaces de reducir la fracción lábil de Cd y Ni en el T2, y Zn en los tratamientos T2 y T4 en el SR en comparación con el suelo SNR. Hinsinger (1998) explicó el agotamiento o el enriquecimiento de la rizosfera por la capacidad del suelo para reponer las formas más solubles de metales en esa zona. Por lo tanto, es razonable suponer que la absorción de estos metales en aplicación múltiple (Cd y Ni) fue mayor que la oferta por difusión desde el SNR. Otros autores (Lorenz y col. 1997) también encontraron que las concentraciones de Cd y Zn decrecieron en la solución del suelo durante el crecimiento de plantas de rábano. En contraste con lo anterior, Cr, Cu y Pb, tuvieron la

misma disponibilidad tanto en el SR como en SNR, mostrando diferentes situaciones: Cr se encontró más disponible en el T8, Cu en los T2 y T4, y Pb en los tratamientos T3 y T4. La disponibilidad del Cr se incrementó cuando fue agregado sólo y disminuyó cuando se aplicó con otros metales. Bajo nuestras condiciones experimentales, la gran disponibilidad del Cr podría explicarse por el pH neutro del suelo cuando este elemento se encuentra sólo; el cromo hexavalente es un anión, y su absorción disminuye a medida que se incrementa el pH del suelo (Guertin y col. 2004). Vale destacar que únicamente para este elemento se registró una correlación estadísticamente significativa entre pH y disponibilidad. A diferencia de Cr, la disponibilidad del Cu tendió a aumentar cuando se agregó sólo, o en combinación con los otros cinco metales pesados. Por lo tanto es posible que la disponibilidad de este elemento este relacionada con el nivel de Cu aplicado al suelo, y no vinculado a interacciones con los otros metales. En general, dado que el Cu presenta gran mayor afinidad por la materia orgánica del suelo (ver capítulo III) parece posible que a altas concentraciones del mismo en el suelo se saturen los sitios de unión con la materia orgánica, resultando en una mayor concentración de iones del metal libre (la fracción biodisponible). Este resultado concuerda con hallazgos anteriores (capítulo III). En contraste, la disponibilidad de Pb se redujo en aplicación múltiple (efecto antagónico), y aumentó cuando se agregó en forma ternaria (efecto sinérgico). El Pb es conocido por su falta de movilidad en el suelo, principalmente debido a la precipitación del mismo con fosfatos insolubles, carbonatos e hidróxidos (Blaylock & Huang, 2000). La mayor disponibilidad de Pb en aplicaciones ternarias podría ser resultado de la interacción antagónica entre Cu y Zn (Kabata-Pendias & Pendias, 2000; Adriano, 2001; Panou-Filotheou & Bosabalidis, 2004), lo que dejaría este elemento más disponible para las plantas.

En general, los tratamientos con mayores concentraciones de metales disponibles mostraron mayor acumulación en los tejidos vegetales, especialmente en las raíces; excepto en el caso de Cr, las aplicaciones individuales de los metales resultaron en menor acumulación de dichos elementos en las plantas en relación a cuando se aplicaron varios metales simultáneamente. Es conocido que la bioacumulación de ciertos metales en los tejidos vegetales es frecuentemente influenciada por la presencia de otros metales, dando lugar a inhibición o mayor bioacumulación de los mismos (An y col. 2004). En este sentido, MacFarlane & Burchett (2002), informaron que la exposición a varios metales simultáneamente puede resultar en un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática acompañada por un incremento en la absorción celular y toxicidad. Sin embargo, nuestros resultados contrastan con lo informado por Smilde (1981), quien trabajando con lodos de depuradora mezclada con sales metálicas encontró concentraciones más altas en los tejidos cuando los metales se añadieron sólo. La gran acumulación de Cr en las plantas pertenecientes al T8 podría ser resultado de las altas concentraciones disponibles de este elemento en el suelo y la consiguiente reducción de la barrera de suelo-planta (Hall y col. 2002). Por otro lado, los efectos tóxicos del Cr dependen principalmente de la especiación del metal, lo cual determina su absorción, translocación y acumulación. Además, la vía de transporte del Cr (VI) involucra transportadores de aniones esenciales, tales como el sulfato (Shanker y col. 2005).

Cadmio, Ni y Zn fueron los elementos que mostraron mayor translocación a parte aérea, especialmente tallos y hojas; es conocido que Cd y Zn se mueven con relativa facilidad desde la raíz a la parte aérea de las plantas (Greger, 2004). La movilidad de Ni en plantas varía entre especies, siendo móvil en algunas plantas (Thiesen & Blincoe, 1988) e inmóvil en otras (Sajwan y col. 1996). Los datos muestran que Zn ejerció un efecto sinérgico sobre la acumulación de Cd en aplicación múltiple; esto se tradujo en un aumento de la concentración de Cd en las raíces, tallos y hojas de *P. hortorum*, comparado a cuando éste elemento fue agregado en aplicación

ternaria e individual. Es sabido que el Zn compite con Cd por los sitios de unión en el suelo, induciendo la disociación del Cd absorbido y como consecuencia aumentaría el Cd en solución (Angelova y col. 2007). Por otro lado, en un experimento con plantas de trigo, Hart y col (2002) encontraron que Cd y Zn mostraron interacción competitiva a nivel membrana de las células radicales. Esto sugeriría la existencia de un sistema de transporte común. Sin embargo, nuestros resultados difieren de los reportados por Roosens y col. (2003), quienes encontraron que altas concentraciones totales de Zn en el suelo disminuyeron la absorción de Cd en *Thlaspi caerulescens* Prayon. Para el caso de Ni, la absorción siguió el orden: aplicación múltiple > ternaria > individual mostrando una interacción antagónica con Cd; este antagonismo podría ser el resultado de la competencia por sitios de absorción disponibles en la superficie de la raíz, cuando Ni se encuentra en aplicación ternaria con Cd. De acuerdo con Crowley y col. (1991) elementos esenciales como  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  y no esenciales como  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  competirían por los mismos transportadores transmembrana. Del mismo modo, Nakazawa y col. (2001) encontraron que la absorción de Ni fue inhibida por la coexistencia de Cd en la solución nutritiva.

Si bien no hubo diferencias estadísticamente significativas, los resultados sugieren que la absorción de Pb fue reducida en aplicación múltiple y ternaria. Estudios previos informan efectos antagónicos sobre la absorción de Pb cuando Pb y Zn fueron aplicados simultáneamente. Según Kabata-Pendias & Pendias (2000), el antagonismo Pb-Zn afecta negativamente la translocación de cada elemento desde la raíz a la parte aérea de la plantas. Del mismo modo, Clarkson & Lütge (1989) informaron que  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  interactúan competitivamente para su absorción en plantas superiores. Finalmente la absorción de Cu siguió el orden aplicación múltiple=ternaria>individual. Este resultado podría ser una indicación de interacciones sinérgicas del Cu con los otros metales en las condiciones de aplicación múltiple y ternaria, ya que en ausencia de estos elementos más iones de Cu se unirían a la materia orgánica resultando en una reducción de la biodisponibilidad del mismo en aplicaciones individuales del elemento.

Finalmente, de acuerdo con Salim y col. (1993) las concentraciones de Cd, Cu y Pb en las plantas de rábano estuvieron directamente relacionadas a la concentración de éstos elementos en el suelo. La matriz de correlaciones de Pearson mostró que para la mayoría de los metales existe una fuerte relación entre la absorción por la planta y la disponibilidad de metal en ambos suelos. Las excepciones fueron Cd, Cu y Zn en algunos tejidos de la planta. La falta de correlación en estos casos sólo implica que los metales pesados disponibles por sí solos fueron determinantes en la absorción por la planta; otros factores podrían estar influyendo en los resultados; por ejemplo, la especie y edad de las plantas, y propiedades del suelo tales como el pH, la capacidad de intercambio catiónico y el contenido de materia orgánica (Adriano, 2001). Además, hay que considerar el aporte de las fracciones menos disponibles, ya que las mismas contribuyen en la absorción total de metales, tal como fue analizado en el capítulo III.

#### 4.5 Conclusiones

El peso aéreo de la plantas fue severamente afectado en varios de los tratamientos, siendo Cr el elemento individual que ejerció el mayor efecto tóxico sobre el crecimiento, seguido por los tratamientos correspondientes en conjunto al nivel A. En general, la rizosfera no desempeñó un papel preponderante en la regulación de la disponibilidad de los metales pesados en esta especie. Para Cd, Ni y Zn solo en los tratamientos T2 y T4 la concentración de metales pesados disponibles en la rizosfera fue significativamente diferente al SNR. En contraste no se observó un efecto de la rizosfera sobre la disponibilidad de Cr, Cu y Pb. Por otro lado, la distribución de los metales dentro de la planta varió con el órgano y metal específico considerado;

algunos tratamientos tuvieron efecto sinérgico en la acumulación, y otros efecto antagónico, mostrando que las respuestas podrían estar relacionados con las mezclas y concentraciones de metales presentes en el suelo. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la competencia entre los iones metálicos con la matriz del suelo y en la superficie de la raíz puede desempeñar un papel importante en la absorción y la acumulación de metales por las plantas de *P. hortorum*.

**La hipótesis 4.1** es rechazada ya que para algunos elementos la absorción estuvo vinculada a factores como nivel de metales aplicados e interacciones con la matriz del suelo o con otros elementos. **La hipótesis 4.2** es aceptada, ya que se registraron diferencias en la absorción, especialmente para los elementos en contaminación múltiple y ternaria respecto a la contaminación simple.

## CAPÍTULO V

### Efecto de la longitud del período de crecimiento de *P. hortorum* sobre la eficiencia de la fitoextracción

#### 5.1 Introducción

La fitoextracción debe considerarse como una tecnología de largo plazo, que puede requerir de varios ciclos de cultivo para reducir la concentración de los contaminantes del suelo a niveles aceptables. El tiempo requerido depende de la concentración y tipo de contaminante(s), de la duración del periodo de crecimiento y de la eficiencia de remoción de la especie utilizada (Prasad & Freitas, 2003). Las plantas seleccionadas con fines de fitoextracción deben ser tolerantes a los metales y eficientes en la translocación de los mismos hacia las porciones cosechables de las plantas (Blaylock & Huang, 2000). Por otro lado, la planta ideal deberá poseer rápido crecimiento, tener raíces profundas, una producción de biomasa abundante, ser fácil de cosechar y capaz de tolerar y acumular una amplia gama de metales en sus partes aéreas (Clemens y col. 2002).

La eficiencia de la fitoextracción está determinada por dos factores clave: la capacidad de hiperacumular metales y la producción de biomasa de la planta (Ebbs & Kochian, 1997; McGrath & Zhao, 2003). En este sentido, la longitud de la temporada de crecimiento afecta tanto la producción de biomasa como la concentración de metal en las plantas. Generalmente, la partición de biomasa varía a lo largo del ciclo de los cultivos, disminuyendo la proporción de biomasa de los órganos vegetativos en favor de los órganos reproductivos, hacia el final del ciclo (Hintz y col. 1994). Habitualmente, la proporción de asimilados o nutrientes que van a los órganos se caracteriza mediante coeficientes de partición de asimilados, que relacionan los nutrientes en un órgano determinado de la planta, a lo largo de dos o más cosechas sucesivas como lo informaron, entre otros, Scheiner y col. (2000) para los macronutrientes. Estos autores observaron que en la soja la máxima acumulación de N ocurrió hacia el final del ciclo vegetativo, previo al inicio del llenado de granos, mientras la acumulación máxima de P ocurrió al comienzo del llenado de granos. La participación del K, en cambio, fue similar a la acumulación de biomasa. Por otro lado la absorción y acumulación de metales desde el suelo son influenciadas por varios factores, entre ellos, el tiempo de exposición y la edad de las plantas.

La concentración de metales en los diferentes órganos de la planta a lo largo de las cosechas destructivas podría ser útil para decidir el momento óptimo de cosecha a fin de lograr la máxima extracción desde el suelo. Sin embargo, es difícil generalizar acerca de los cambios estacionales en los niveles de metales pesados, ya que parecen variar con el metal y la especie bajo estudio (Weis & Weis, 2004). En este sentido se observó que la eficiencia de remoción de Cd en especies leñosas variaría con la edad del stand (Klang-Westin & Perttu, 2002; Mertens y col. 2006). Otros autores (Perronnet y col. 2003) registraron que la acumulación de Cd y Zn en diferentes estadios de crecimiento de la hiperacumuladora *Thlaspi caerulescens*, varió de acuerdo con el órgano y la edad de la planta. La concentración de Zn en tallos decreció con el tiempo, en tanto que la concentración de Cd permaneció constante a pesar de un incremento en biomasa. Asimismo, en plantas viejas, la acumulación de Cd fue mayor que en las hojas más jóvenes.

No existe consenso en cuanto a la remoción de los metales a lo largo del ciclo de vida de una planta. Se ha supuesto que la eficiencia de remoción de metales no cambia con el tiempo (Knight y col. 1997; Robinson y col. 1998; McGrath y col. 2000) aunque algunos trabajos más recientes han mostrado que la cantidad se modificaría

con el transcurso del mismo (McGrath y col. 2006; Mertens y col. 2006). Algunos autores (Ernst y col. 1996) encontraron una rápida disminución de la acumulación de metales debido a cambios en la especiación por raíces de plantas en descomposición. Por otro lado, generalmente la absorción de metales es relativamente rápida en los primeros estadios del crecimiento, y disminuye en estadios más avanzados del crecimiento debido al incremento en acumulación de biomasa de las plantas. Dinelli & Lombini (1996) observaron que en plantas creciendo sobre suelos desarrollados sobre minas de Cu abandonadas, la concentración de metales fue generalmente mayor en estadios tempranos del crecimiento vegetativo, debido a la relativamente alta absorción de nutrientes comparada con la tasa de crecimiento. Posteriormente tuvo lugar un periodo de crecimiento vigoroso, el cual diluyó las concentraciones hasta el estadio de floración, momento en el cual se obtuvo la mínima concentración para la mayoría de los elementos estudiados.

Finalmente, la cantidad de metales extraídos en el ciclo de cultivo, debe ser multiplicada por el número de ciclos requeridos a fin de alcanzar un valor objetivo de metales en el suelo. Algunos ejemplos de estos cálculos han sido informados por otros autores (Ernst, 1996; Robinson y col. 1998; Keller y col. 2003) aunque exceden el alcance de esta tesis. Por otro lado, a fin de evaluar la capacidad de acumulación de metales, han sido propuestos diferentes índices. Entre ellos, el índice de tolerancia (TIN), medido en términos relativos a la materia seca total producida por las plantas creciendo en el suelo control. La tasa de crecimiento relativo (TCR), la cual es ampliamente utilizada por su influencia sobre la producción de biomasa de las plantas y, en consecuencia, sobre la capacidad de éstas para acumular metales (Lutts y col. 2004). Por último, la tasa de absorción (UR) de metales pesados, ya que permite cuantificar la velocidad de transporte de metales del suelo a las plantas (Singh & Agrawal, 2007). Los objetivos de este capítulo fueron: determinar la acumulación de metales y su tasa de absorción en la biomasa de raíces, tallos, hojas y flores a lo largo de diferentes momentos de cosecha; además evaluar el potencial de los índices de acumulación de metales mencionados anteriormente para registrar las variaciones en la producción de biomasa de *P. hortorum* y la concentración de metales. Las hipótesis planteadas fueron que *P. hortorum* presenta una alta velocidad inicial de extracción de los metales pero su mayor acumulación se registra en las hojas en los momentos de máximo crecimiento. La segunda hipótesis plantea que las variaciones en producción de biomasa y acumulación de metales a lo largo del periodo de crecimiento serán reflejados en forma coincidente por los diferentes índices.

## 5.2 Materiales y Métodos

Se desarrolló un nuevo experimento con la especie *P. hortorum*. Los tratamientos consistieron en suelo control, y los niveles M y A de enriquecimiento con seis metales según las condiciones y características descritas en el capítulo II. Se determinó el contenido de metales en el material cosechado en distintos momentos de crecimiento de la planta. Para tal fin, se efectuaron cosechas destructivas cada 30 días aproximadamente, por lo cual se trabajó con 8 repeticiones por tratamiento.

### 5.2.1 Peso seco total, radical y de los componentes de la biomasa aérea de *P. hortorum* y cálculos de TIN y TCR

En cada cosecha, se separó la biomasa aérea en raíces, tallos, hojas, y flores y se seco a 70°C por aproximadamente 72 hs. Seguidamente, se pesó el material vegetal de raíces, tallos, hojas y flores a fin de cuantificar la producción de biomasa de cada tratamiento.

El TIN, el cual representa la relación entre la biomasa de las plantas creciendo en los suelos con metales relativo a las plantas que crecieron en el suelo control (Antosiewicz, 1995), se calculó tal como se explica en el Anexo.

Además se calculó la TCR de las plantas para cada momento de cosecha en base a los pesos secos totales de las mismas; el peso seco inicial fue estimado en base al secado en estufa de 3 plantas hasta peso constante al inicio del experimento. Este valor fue empleado como referente para la transformación de los pesos frescos iniciales a peso seco. La TCR ( $\text{g.g}^{-1}$  de peso seco día<sup>-1</sup>), fue calculada según la ecuación de Blackman, modificada por Hunt (1978); dicha tasa resultó de la siguiente fórmula:

$$\text{TCR} = (\ln P_f - \ln P_i) / \Delta T,$$

donde  $\ln P_f$  y  $\ln P_i$  son el logaritmo neperiano del peso seco al inicio y al final del experimento, y  $\Delta T$  es el periodo de tiempo correspondiente al experimento.

### 5.2.2 Concentración de metales en raíces, tallos, hojas, y flores de *P. hortorum* y cálculos de la UR.

Para determinar la concentración de metales en los órganos de *P. hortorum* se molió el material vegetal de raíces, tallos, hojas, y flores y se los sometió a una digestión húmeda con una mezcla de ácidos nítrico y perclórico (Jones & Case, 1990). La concentración de metal en cada compartimiento de la planta se determinó por ICP - OES.

Con el fin de evaluar el momento de máxima extracción de los metales, se estimó la tasa de absorción (UR) ( $\text{mg.planta}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) de metales en base a la siguiente fórmula:

$$\text{UR} = \frac{M_2 \cdot W_2 - M_1 \cdot W_1}{t_2 - t_1}$$

Donde  $M_1$  y  $M_2$  representan la concentraciones de metales en los tejidos de la plantas y  $W_1$  y  $W_2$  son las biomásas de la plantas en los tiempos 2 y 1 (Singh & Agrawal, 2007).

### 5.2.3 Análisis estadístico

El peso seco de las plantas, la concentración de metales en los diferentes órganos, TIN y TCR fueron analizados usando el programa Statistics 8.0. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza de 2-vías (ANOVA) con el fin de determinar diferencias significativas entre tratamientos, momentos de cosecha, y concentración de metales en los diferentes órganos de las plantas. Las diferencias entre las medias individuales fueron testeadas el Test de Tukey a un nivel de significación de 0,05.

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Peso seco total, radical y de los componentes de la biomasa aérea de *P. hortorum* y cálculos de TIN y TCR

El estrés por metales no tuvo efectos sobre la supervivencia de las plantas, por lo que todas las plantas se mantuvieron vivas durante el transcurso del experimento. En el Cuadro 5.1 se observan el peso seco total, radical y de los componentes de la

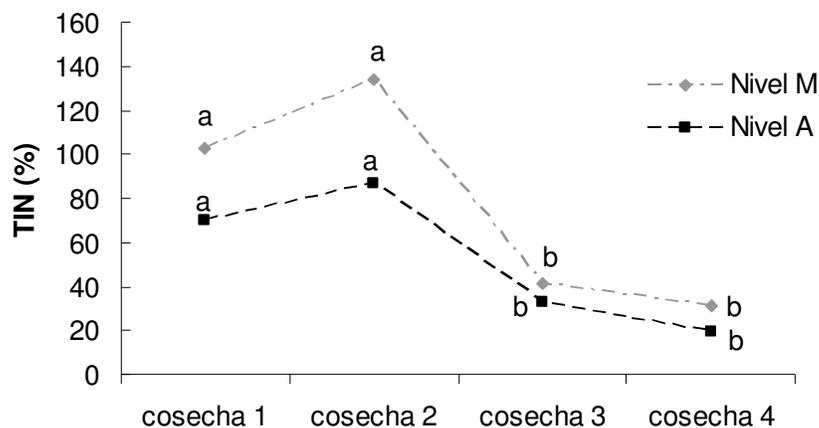
biomasa aérea. El peso seco total de las plantas fue significativamente afectado por el incremento en concentración de metales del suelo (Cuadro 5.1), registrándose una interacción “tratamiento x momento de cosecha” estadísticamente significativa; se observó una reducción en el peso seco total estadísticamente significativo para la cosechas 3 y 4 ( $P < 0,05$ ) en las plantas de los tratamientos con metales comparadas con el control. El peso seco de raíces disminuyó significativamente ( $P < 0,05$ ) en el nivel A comparado con el peso seco del control y el nivel M pero no se observó efecto del momento de cosecha sobre este parámetro. Los tallos y hojas mostraron una interacción “tratamiento x momento de cosecha” estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ). En las plantas control el peso seco de estos 2 componentes se incrementó hacia el final del experimento; en contraste, en los tratamientos con metales, el peso seco de tallos se mantuvo estable mientras que el peso seco de hojas tendió a disminuir. En el nivel M algunas repeticiones no produjeron flores mientras que en el nivel A no hubo producción de estas últimas, motivo por el cual no pudo efectuarse análisis estadístico.

**Cuadro 5.1** Peso seco total, radical y de los componentes de la biomasa aérea de *P. hortorum* por tratamiento y momento de cosecha.

Tratam.	Cosecha	Peso seco (g)				
		Total	Raíces	Tallos	Hojas	Flores
Control	1	4,7±0,2 c	0,6±0,1 a	2,1±0,3 b	2,3±0,2 abc	0,8±0,9
	2	3,3±1,6 c	0,4±0,1 a	1,7±1,0 b	0,6±0,2 c	0,6±0,1
	3	9,0±0,1 b	0,6±0,3 a	3,5±0,5 ab	4,2±0,7 ab	1,5±0,4
	4	14,6±0,1 a	0,8±0,1 a	4,2±0,3 a	5,4±1,22 a	1,3±0,5
Nivel M	1	4,9±0,6 c	0,5±0,2 a	2,1±0,1 b	1,9±0,9 bc	0,3
	2	4,1±0,9 c	0,6±0,3 a	2,2±0,4 ab	1,4±1,0 bc	0,4
	3	3,7±1,9 c	0,4±0,1 a	1,8±0,4 b	1,2±1,3 bc	0,5
	4	4,5±0,4 c	0,9±0,1 a	2,3±0,3 ab	0,6±0,0 c	0,2
Nivel A	1	3,3±0,5 c	0,5±0,0 b	2,1±0,3 b	0,7±0,1 bc	sin flores
	2	2,3±0,7 c	0,4±0,1 b	1,5±0,6 b	0,4±0,0 abc	sin flores
	3	3,0±0,9 c	0,4±0,2 b	2,5±0,7 ab	0,1±0,1 ab	sin flores
	4	2,7±0,3 c	0,3±0,1 b	1,9±0,2 b	0,2±0,2 bc	sin flores
ANOVA	Tratamiento	***	*	**	**	---
	Cosecha	***		*	*	---
	Trat.xCosecha	***		*	**	---

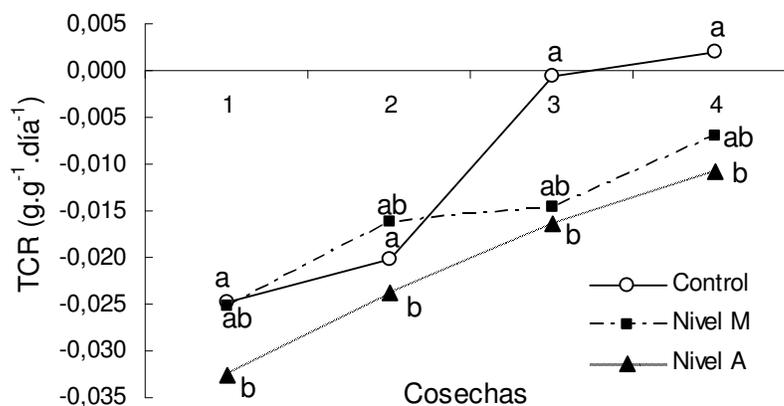
Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Niveles de significancia para tratamientos, momento de cosecha, y la interacción tratamiento x momento de cosecha: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . --- sin análisis estadístico.

El TIN (Figura. 5.2), en términos de porcentaje con respecto a la producción de materia seca del control, varió a lo largo de las cosechas en ambos tratamientos enriquecidos con metales; este índice arrojó diferencias significativas entre momentos de cosecha ( $p < 0,05$ ), mostrando en el nivel M valores mayores al 100% para las cosechas 1 y 2, indicando un incremento neto en biomasa en relación al control. Los tratamientos enriquecidos con metales mostraron valores muy inferiores al 100% en la cosechas 3 y 4, mostrando disminución del crecimiento.



**Figura 5.2** Índice de tolerancia (TIN) de *P. hortorum* en los tratamientos nivel M y nivel A en función del momento de cosecha. Las medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente ( $p \leq 0,05$ ).

En la Figura 5.3 se observa la TCR para los tres tratamientos. En este caso el ANOVA reveló un efecto significativo de los factores tratamiento y momento de cosecha, aunque no existió interacción entre los mismos.



**Figura 5.3** Tasa de crecimiento relativo (TCR) de *P. hortorum* en función del momento de cosecha. Las medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente ( $p \leq 0,05$ ).

La TCR se incremento a lo largo del experimento, siendo el valor de este parámetro estadísticamente superior para las cosechas 3 y 4; por otro lado, los tratamientos con metales presentaron menores valores de TCR comparados con el tratamiento control, evidenciándose un retraso en el crecimiento de estos tratamientos

5.3.2 Concentración de metales en raíces, tallos, hojas, y flores de *P. hortorum* y cálculos de la UR.

La concentración de todos los metales fue mayor en la raíces (Cuadro 5.2) comparada con los otros órganos (raíces>tallos>hojas>flores). En el tratamiento control, Cd, Cr, Pb y Ni se encontraron debajo del límite de detección; en contraste, Cu y Zn se encontraron dentro de los rangos normales en planta y no mostraron diferencias significativas en acumulación a lo largo del experimento en el tratamiento control. La concentración de metales en el nivel M en los diferentes momentos de cosecha (Cuadro 5.2) mostró un patrón similar al nivel A. Las concentraciones de Cd y Ni en raíces mostraron un incremento a través del tiempo, mientras que las concentraciones de Cu, Cr, Pb y Zn no mostraron un patrón consistente a través de las cosechas. El ANOVA reveló un efecto significativo de tratamiento en la concentración de metales en los diferentes órganos de las plantas ( $P<0,05$ ), aunque no hubo efecto del momento de cosecha, excepto para los casos de Cd, Ni y Pb en raíces; por otro lado, se detectó una interacción significativa tratamiento x momento de cosecha para la concentración de Cd y Ni en raíces, mostrando que la concentración en este órgano varía con el tratamiento y momento de cosecha. Este último resultado podría deberse a que la raíz es el órgano principal de absorción y acumulación de metales, y por ende, el que más está expuesto a sus efectos tóxicos.

**Cuadro 5.2** Acumulación de metales en raíces de *P. hortorum* por tratamiento y momento de cosecha.

Cosecha	Tratamiento	Concentración de metales en raíces (mg/kg)					
		Cu	Zn	Cd	Ni	Cr	Pb
1	Control	12,9± 2,9	50,5± 14,5	ND (LD=0,2)	ND (LD=2,0)	ND (LD=2,0)	ND (LD=4,0)
2		84,3± 60,1	77,8± 17,1	ND (LD=0,2)	ND (LD=2,0)	ND (LD=2,0)	ND (LD=4,0)
3		11,4± 1,5	53,8± 4,2	ND (LD=0,2)	ND (LD=2,0)	ND (LD=2,0)	ND (LD=4,0)
4		6,3± 0,4	26,6± 0,9	ND (LD=0,2)	ND (LD=2,0)	ND (LD=2,0)	ND (LD=4,0)
1	Nivel M	187,0± 58,0	2397,9± 283,7	24,6± 3,2	323,3± 14,4	100,7± 37,3	164,3± 59,3
2		323,7± 36,5	3596,3± 4,9	40,8± 3,2	473,3± 64,4	123,8± 24,1	222,1± 22,6
3		122,4± 43,3	2753,7± 17,5	25,8± 0,6	359,8± 14,2	89,6± 14,8	99,5± 44,6
4		118,7± 8,0	3815,9± 22,4	40,2± 1,4	721,5± 90,7	90,5± 22,5	111,7± 12,7
1	Nivel A	646,8± 65,8	5003,2± 2127,1	73,2± 10,4	815,6± 169,9	225,8± 34,6	202,4± 46,4
2		748,2± 398,2	7271,7± 932,9	94,4± 13,9	1009,1± 3,2	347,5± 89,2	340,5± 52,8
3		466,1± 125,3	9501,9± 966,0	129,0± 10,7	1245,3± 16,9	194,8± 19,4	152,2± 34,0
4		941,8± 80,6	9417,1± 699,1	120,5± 12,8	1550,5± 228,0	353,0± 11,5	270,1± 45,6
<b>ANOVA</b>							
	Tratamiento	***	***	***	**	***	***
	Cosecha	ns	ns	*	**	ns	*
	Tratx Cosecha	ns	ns	*	*	ns	ns

Niveles de significancia para tratamientos, momento de cosecha, y la interacción tratamiento x momento de cosecha: \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ; ns: no significativo; ND (no detectado) y LD (valor del límite de detección).

En contraste, la concentración de metales en tallos y hojas (Cuadros 5.3 y 5.4) no arrojó diferencias significativas a lo largo de las cosechas; sin embargo, en el nivel M las concentraciones se mantuvieron estables y en el nivel A la tendencia muestra una disminución de la concentración para la cosechas 3 y 4.

**Cuadro 5.3** Acumulación de metales en hojas de *P. hortorum* por tratamiento y momento de cosecha.

Cosecha	Tratamiento	Concentración de metales en hojas (mg/kg)					
		Cu	Zn	Cd	Ni	Cr	Pb
1	Control	10,0± 0,8	50,1± 9,4	ND (LD=0,2)	ND (LD=2,0)	ND (LD=2,0)	ND (LD=4,0)
2		6,6± 0,7	38,8± 0,2	ND (LD=0,2)	ND (LD=2,0)	ND (LD=2,0)	ND (LD=4,0)
3		6,9± 1,3	36,9± 2,4	ND (LD=0,2)	ND (LD=2,0)	ND (LD=2,0)	ND (LD=4,0)
4		4,1± 0,1	26,8± 1,1	ND (LD=0,2)	ND (LD=2,0)	ND (LD=2,0)	ND (LD=4,0)
1	Nivel M	21,0± 5,0	307,9± 92,3	5,0± 2,0	77,0± 19,1	38,0± 18,1	59,0± 29,1
2		15,9± 9,9	300,1± 176,0	8,1± 0,0	75,9± 45,1	33,3± 26,3	43,2± 36,3
3		18,9± 2,9	642,5± 16,0	9,7± 0,7	148,2± 11,4	35,8± 3,9	46,7± 10,8
4		7,9± 0,1	342,6± 2,6	5,9± 0,1	137,4± 15,5	7,9± 0,1	17,9± 2,2
1	Nivel A	32,9± 15,0	1426,9± 689,3	26,0± 14,0	328,0± 151,2	46,9± 14,9	74,9± 28,9
2		48,0± 24,1	1409,5± 711,9	24,0± 10,0	349,9± 130,3	97,0± 53,1	135,0± 79,2
3		13,9± 0,1	890,4± 15,0	17,8± 1,9	160,5± 30,6	15,8± 0,1	21,8± 0,2
4		20,1± 1,9	643,5± 326,3	10,8± 1,7	109,4± 9,4	13,8± 4,4	21,3± 2,5
ANOVA	Tratamiento	*	***	***	*	*	*
	Cosecha	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	TratxCosecha	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Niveles de significancia para tratamientos, momento de cosecha, y la interacción tratamiento x momento de cosecha: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; ns: no significativo; ND (no detectado) y LD (valor del límite de detección).

**Cuadro 5.4** Acumulación de metales en tallos de *P. hortorum* por tratamiento y momento de cosecha.

Cosecha	Tratamiento	Concentración de metales en tallos (mg/kg)					
		Cu	Zn	Cd	Ni	Cr	Pb
1	Control	3,25± 2,7	43,0± 8,1	ND (LD=0,2)	ND (LD=2,0)	ND (LD=2,0)	ND (LD=4,0)
2		3,5± 1,5	27,9± 8,0	ND (LD=0,2)	ND (LD=2,0)	ND (LD=2,0)	ND (LD=4,0)
3		4,4± 0,2	41,7± 12,0	ND (LD=0,2)	ND (LD=2,0)	ND (LD=2,0)	ND (LD=4,0)
4		1,9± 1,9	14,9± 12,9	ND (LD=0,2)	ND (LD=2,0)	ND (LD=2,0)	ND (LD=4,0)
1	Nivel M	26,2± 0,6	449,2± 42,3	7,8± 0,8	83,0± 1,6	20,8± 5,1	39,1± 5,7
2		24,8± 4,9	672,2± 195,9	12,6± 4,3	118,6± 39,2	18,6± 3,1	43,6± 5,8
3		37,4± 9,5	1010,6± 66,6	14,1± 2,2	149,9± 19,7	30,4± 8,5	70,3± 18,4
4		33,2± 4,4	1110,7± 101,1	12,7± 2,8	166,6± 16,1	26,3± 0,6	79,9± 4,7
1	Nivel A	104,7± 47,6	3633,9± 1587,3	55,3± 29,8	571,8± 243,1	61,2± 33,7	113,6± 60,5
2		103,7± 23,9	5614,5± 964,7	96,7± 28,9	1017,2± 179,0	63,8± 20,0	152,6± 48,9
3		57,2± 47,5	3260,7± 3155,9	38,0± 33,1	830,5± 817,2	42,9± 33,1	82,8± 73,2
4		51,8± 3,2	3333,2± 417,9	37,4± 0,1	545,1± 15,7	31,6± 0,2	74,7± 3,7
ANOVA	Tratamiento	***	***	*	**	***	***
	Cosecha	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	TratxCosecha	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Niveles de significancia para tratamientos, momento de cosecha, y la interacción tratamiento x momento de cosecha: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; ns: no significativo; ND (no detectado) y LD (valor del límite de detección).

En el Cuadro 5.5 se presenta la concentración de metales en las flores para los 3 tratamientos. Nuevamente Cu y Zn se encontraron dentro del límite de detección en el tratamiento control. La producción de flores fue muy afectada en los tratamientos

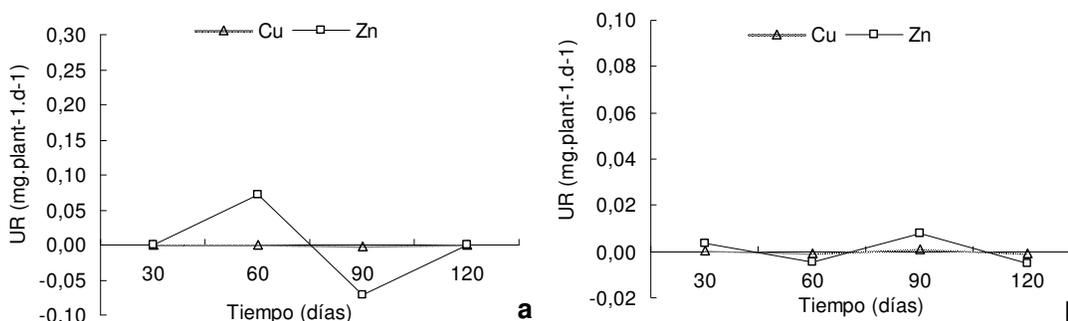
enriquecidos con metales, resultando totalmente inhibida la floración en el nivel A. Debido al escaso material recolectado, no se pudo realizar el análisis estadístico de estos datos, pero la tendencia general indica que la concentración los metales en los niveles M y A se incrementaron con respecto al tratamiento control.

**Cuadro 5.5** Acumulación de metales en flores de *P. hortorum* por tratamiento y momento de cosecha.

Cosecha	Tratamiento	Concentración de metales en flores (mg/kg)					
		Cu	Zn	Cd	Ni	Cr	Pb
1	Control	21,2±16,0	33,0±11,0	ND (LD=0,2)	ND (LD=2,0)	ND (LD=2,0)	ND (LD=4,0)
2		10,0±0,0	41,5±12,0	ND (LD=0,2)	ND (LD=2,0)	ND (LD=2,0)	ND (LD=4,0)
3		9,9±0,0	43,6±19,7	ND (LD=0,2)	ND (LD=2,0)	ND (LD=2,0)	ND (LD=4,0)
4		2,9±4,0	24,9±1,2	ND (LD=0,2)	ND (LD=2,0)	ND (LD=2,0)	ND (LD=4,0)
1	Nivel M	16,5*	99,3*	16,6*	15,6*	16,6*	15,5*
2		96,8±116,0	139,2±84,7	8,4±8,8	45,3±43,3	11,1±5,0	17,1±3,4
3		13,7*	87,6*	2,4*	87,6*	5,7*	8,8*
4		17,8*	333,3*	4,4*	88,9*	8,9*	17,8*
1	Nivel A	s/f	s/f	s/f	s/f	s/f	s/f
2		s/f	s/f	s/f	s/f	s/f	s/f
3		13,2*	153,7*	44,1*	125,2*	5,9*	8,3*
4		s/f	s/f	s/f	s/f	s/f	s/f

ns: no significativo; s/f: sin flores; \*sin repetición. ND (no detectado) y LD (valor del límite de detección).

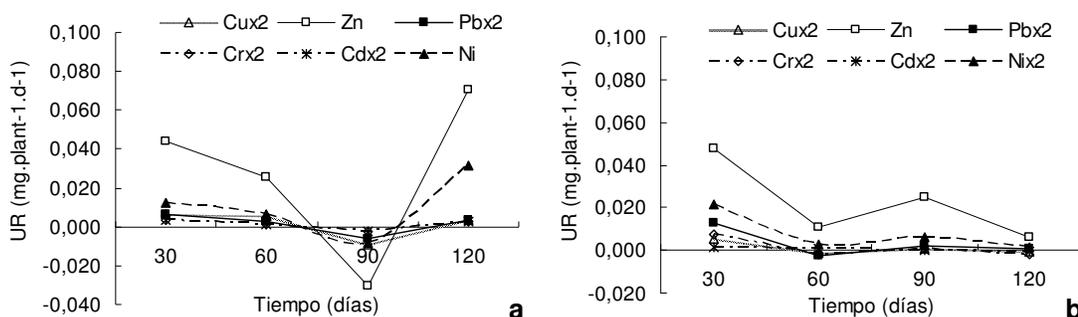
La Figura 5.4 muestra la tasa de absorción ( $\text{mg planta}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) de metales para raíces (a) y biomasa aérea (b) de los tratamientos control. La absorción de Cu, presentó una tasa estable tanto para raíces (Figura 5.4a) como parte aérea (Figura 5.4b); zinc, en cambio, mostró tasas variables en ambos órganos, mostrando una aparente tendencia decreciente en el caso de la biomasa aérea.



**Figura 5.4** Tasa de absorción de metales ( $\text{mg/planta/d}^{-1}$ ) de raíces (a) y biomasa aérea (b) de *P. hortorum* en el tratamiento control en función del momento de cosecha.

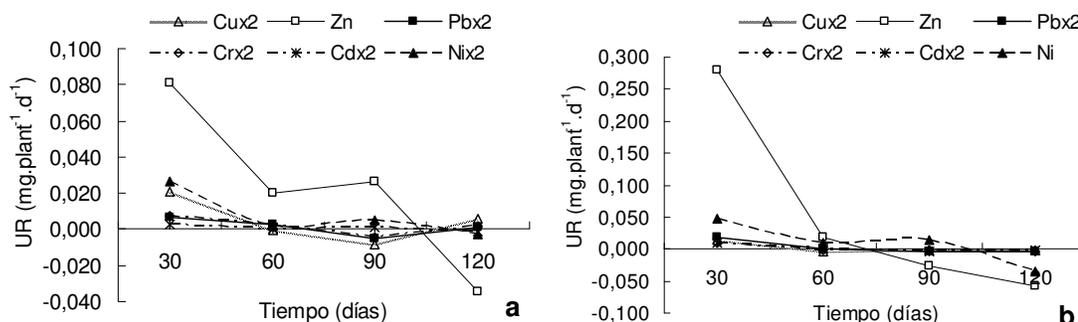
La UR de raíces en el nivel M (Figura 5.5 a) mostró 2 patrones principales a lo largo de las cosechas: las tasas para Zn y en menor medida Ni fueron positivas al comienzo y al final del periodo de crecimiento, registrándose las menores UR en la cosecha 3 aproximadamente. Los valores de UR para Cd, Cr, Cu, y Pb, en cambio, fueron prácticamente constantes a lo largo de las cosechas. La UR para la biomasa

aérea (Figura 5.5 b) fue generalmente positiva; Zinc y Ni, en menor medida, mostraron un decrecimiento en este parámetro a través las cosechas. El resto de los metales mostraron UR más estables.



**Figura 5.5** Tasa de absorción de metales ( $\text{mg/planta/d}^{-1}$ ) de raíces (a) y biomasa aérea (b) de *P. hortorum* en el nivel M en función momento de cosecha.

Las UR para las raíces en el nivel A (Figura 5.6 a) fueron variables: Zn y Ni tuvieron tasas positivas al comienzo, y negativas al final del periodo de crecimiento, por lo que la UR progresivamente disminuyó en el transcurso del experimento. La biomasa aérea en el nivel A (Figura 5.6 b) mostró tasas decrecientes a través del tiempo, llegando a tasas negativas en los casos de Zn y Ni. Por el contrario, Cd, Cr, Cu y Pb mostraron tasas más estables tanto en la biomasa aérea como de raíces.



**Figura 5.6** Tasa de absorción de metales ( $\text{mg/planta/d}^{-1}$ ) de raíces (a) y biomasa aérea (b) de *P. hortorum* en el tratamiento nivel A en función momento de cosecha.

## 5.4 Discusión

Tal como se viene observando en los distintos capítulos, los metales ejercieron efectos negativos sobre el crecimiento aéreo de las plantas, resultando las raíces menos afectadas por las concentraciones crecientes de metales en el suelo. La mortalidad inicial de las hojas y el recambio de las mismas fue mayor para el nivel A comparado con nivel M. Esto coincide con lo informado por Dan y col. (2002), quienes encontraron que cuando se expuso geranios aromáticos a distintas concentraciones de cadmio y níquel se registraron síntomas de fitotoxicidad principalmente en las hojas maduras, las cuales mostraron clorosis y senescencia temprana. De acuerdo con Blum (1997) la reducción de la superficie foliar es considerada un mecanismo de evasión

que permite minimizar la pérdida de agua en condiciones de estrés. Por otro lado, al momento de cosecha muy pocas plantas se encontraban con flores en los suelos enriquecidos con metales, especialmente en el nivel A; según Saikkonen y col. (1998) la floración es un parámetro muy sensible a los metales pesados. Esto último podría actuar como una fuerza selectiva especialmente en especies que dependen de la producción de semillas, debido a que se incrementan las probabilidades de que la planta no sea capaz de completar su reproducción.

Los efectos negativos de los metales sobre la producción de biomasa también se ven reflejados en los índices de tolerancia, los cuales son una herramienta útil a fin de caracterizar la resistencia de la plantas a ellos. Valores menores al 100% indican un decrecimiento neto en la biomasa y sugieren que las plantas se encuentran estresadas, mientras que valores del 100% indican que no hay diferencias con respecto al tratamiento control. Por otro lado, valores mayores al 100% indican un incremento neto en biomasa y sugieren que las plantas expresan un “efecto dilución” (Audet & Charest, 2007). Bajo nuestras condiciones experimentales los valores para esta relación estuvieron inversamente relacionados con la longitud de la temporada de crecimiento. Este resultado tendría implicancias prácticas, ya que a partir de las cosechas 3 y 4 la gran disminución en el peso seco de las plantas comprometería su eficiencia para acumular metales, particularmente en la biomasa aérea.

Las tasas de crecimiento relativo se mostraron negativas tanto en los tratamientos con agregado de metales como en el control al principio del experimento; las tasas negativas del control podrían ser el resultado de variables no consideradas en este capítulo, como por ejemplo senescencia natural según la estación del año. Por otro lado, la TRC se incremento significativamente para todos los tratamientos; esto sugeriría que los niveles M y A se recuperaron luego del impacto inicial, para crecer a una tasa más lenta con respecto al control. Nuestros resultados coinciden con otros autores (Ghnaya y col. 2007) quienes encontraron una reducción significativa de las TCR de plantas tratadas con Cd respecto a las plantas control; en forma similar, Banerjee & Sarker (1997) obtuvieron tasas de crecimiento relativo negativas para *S. rotundifolia* después de estar en contacto con Pb durante 6 días. Los valores negativos de este índice en los tratamientos con agregado de metales podrían explicarse por el incremento de hojas senescentes con respecto al tratamiento control (Davidson & Campbell 1984). La menor TCR en el tratamiento nivel A sería consecuencia de la significativa reducción de biomasa aérea registrada en este tratamiento.

La raíces fueron los órganos donde se registró la mayor concentración de todos los metales lo cual es un fenómeno común en plantas (Adriano, 2001). Por otro lado, es también conocido que el crecimiento aéreo es mas sensible a los metales pesados, a pesar de las bajas concentraciones de metales registradas en los órganos aéreos comparados con las raíces; en este sentido, se ha hipotetizado que las raíces podrían tener un papel importante en la retención de metales evitando que un exceso de los mismos llegue a las partes aéreas (Mazhoudi y col. 1997). El bajo transporte de todos los metales hacia la parte aérea de las plantas de la especie estudiada podría deberse a la saturación de la absorción en raíces cuando las concentraciones internas son altas (Zhao y col. 2003). Aunque no se encontraron efectos significativos del momento de cosecha sobre la concentración de metales en las hojas, la tendencia muestra una disminución de la concentración en este órgano en las cosechas 3 y 4 sobre todo en el nivel A indicando que a altas concentraciones operaría algún mecanismo de exclusión (MacFarlane y col. 2003). Esto último contrasta con lo informado por Verkleij & Schat (1990) quienes encontraron que las concentraciones de metales en hojas aumentarían a medida que las hojas envejecen debido transporte pasivo dentro de mismas. El movimiento de los metales hacia las hojas más viejas sería una forma que tienen las plantas de eliminar parte de la carga metálica (Verkleij & Schat, 1990). Las flores

mostraron la menor concentración de metales comparado con los otros órganos, lo cual coincide con lo encontrado por Davies y col. (2001) en plantas de girasol.

Finalmente, tal como fue mencionado anteriormente, la UR varía en función de la concentración de metal en los órganos de la planta y la biomasa final producida a cosecha; estos dos componentes deben ser maximizados a fin de lograr la remediación del suelo en un periodo razonable de tiempo. Sin embargo la acumulación de metales en los tejidos de las plantas puede disminuir debido a un efecto dilución cuando la tasa de absorción es menor a la tasa de producción de biomasa. Nuestros datos indican que las tasas de absorción fueron bastante estables mostrando para algunos elementos (Zn y Ni) tasas decrecientes hacia las cosechas 3 y 4. En general, la mayor tasa de absorción de casi todos los metales se registró principalmente durante las primeras 4 semanas. Por otro lado, sería poco razonable asumir una remoción lineal de los metales en el tiempo, dado que las concentraciones decrecientes en el suelo pueden resultar en una disminución de la absorción por la planta (Brown y col. 1994). En algunas circunstancias el cambio en la concentración de metales solubles puede ser aproximadamente lineal, sin embargo en la mayoría de los casos es esperable un decrecimiento logarítmico en las sucesivas cosechas (Robinson y col. 1999).

## 5.5 Conclusiones

El peso aéreo de las plantas, TIN y TCR fueron afectados en los tratamientos con metales. Si bien las TCR fueron negativas para los tratamientos con agregado de metales, las mismas fueron incrementándose a lo largo de las cosechas, mostrando que las plantas reiniciaron su crecimiento luego del periodo inicial de estrés. Sin embargo, en general, la longitud del periodo de crecimiento no tuvo efectos significativos en la concentración de metales en los órganos de *P. hortorum*, excepto en los casos de Cd y Ni en raíces. Por otro lado las tasas de absorción fueron estables a lo largo de las cosechas en los casos de Cd, Cr, Pb y Cu; en cambio fueron variables para Ni y Zn, los cuales mostraron tasas decrecientes en el nivel A de metales en el suelo. Nuestros resultados sugieren que la capacidad de remoción de las plantas se mantuvo más o menos estable a lo largo de las cosechas. Por lo tanto, desde el punto de vista tecnológico, de ser utilizada esta especie en fitorremediación, las plantas deberían ser cosechadas cada un mes a fin de asegurar la máxima exportación de metales a cosecha. Por último, la observación acerca de que las hojas registraron mayor concentración de metales en las primeras 2 cosechas podría tener también consecuencias prácticas en coincidencia con lo anterior. Si se tiene en cuenta la contribución de las hojas en el almacenamiento de metales, estas deberían ser removidas antes de la senescencia a fin de evitar su retorno al suelo.

*Por todo lo mencionado anteriormente se rechaza la **hipótesis 5.1**, ya que la mayor velocidad de extracción de los metales se presentó en las etapas iniciales de crecimiento, momento en que la biomasa de las plantas fue mayor, y la mayor acumulación se presentó en raíces. La **hipótesis 5.2** se acepta, ya que todos los índices analizados coinciden en mostrar que la mayor acumulación de metales se produce en las primeras 2 cosechas.*

## CAPÍTULO VI

### Cambios morfológicos inducidos por los metales y efectos sobre la calidad ornamental de malvón

#### 6.1 Introducción

Diversos estudios sugieren que las plantas ornamentales son capaces de hacer frente a algunos contaminantes, como metales pesados, y pueden representar una alternativa para recuperar o cubrir con vegetación sitios contaminados (Caselles y col. 2004; Bizoux y col. 2004; Sharma y col. 2004; Seo y col. 2008). Sin embargo, la información generada acerca de los efectos de los metales sobre el crecimiento y calidad ornamental de este tipo de plantas es muy escasa (Liu y col. 2008). En ese sentido, las plantas han desarrollado algunas estrategias para resistir la toxicidad de los elementos traza (Cobbet & Goldbrough, 2002). La mayoría de estas estrategias consisten en la prevención de la acumulación de estos elementos en los tejidos aéreos, mediante su retención en las raíces (Baker, 1987). Otras plantas tolerantes pueden captar y translocar estos elementos a la parte aérea, donde son almacenados en un estado no perjudicial, por ejemplo, mediante compartimentación y complejación en las vacuolas celulares (Sanità di Topi & Gabrielli, 1999). Ambos tipos de estrategias pueden plantear un costo energético, por lo que existe un costo en relación con la tolerancia, con consecuencias negativas para procesos tales como el crecimiento o la reproducción de las plantas (Baker, 1987; Cox, 1988a, b; Hagemeyer, 1999).

Como se ha encontrado en esta tesis, el primer signo de toxicidad por metales es la inhibición del crecimiento radical; numerosos estudios con especies de árboles han mostrado que la exposición a metales provoca una inhibición de la elongación de la raíz o de la producción de raíces finas, disminuyendo en general la biomasa del sistema radical (Arduini y col. 1994; Reichmann y col. 2001; Lunackova y col. 2003). Algunos autores (Rucinska y col. 1999; Arduini y col. 2004) informaron que el estrés por metales pesados puede inducir un engrosamiento de las raíces, incluyendo un incremento en la densidad y diámetro de las mismas. Los metales pesados también tendrían influencia sobre las relaciones planta-agua (Rauser & Dumbroff, 1981; Bishnoi y col. 1993) causando una reducción directa en la superficie de absorción por inhibición de la formación de pelos radicales (Sai Kachout y col. 2009). Esto último puede limitar la capacidad de exploración de las plantas por agua y nutrientes.

Es sabido que la absorción y acumulación de metales en altas concentraciones pueden ser citotóxicas en algunas especies de plantas, causando cambios estructurales y ultra estructurales y afectando el crecimiento y fisiología de las mismas (Zhao y col. 2000; Han y col. 2004). Estos cambios estructurales son importantes en plantas ornamentales ya que las mismas se comercializan siguiendo parámetros de calidad visuales. Existen numerosos parámetros cuantitativos que permiten aproximaciones y cuantificaciones relativas a la calidad ornamental: peso seco por planta, diversas medidas en componentes como hojas y flores o de la planta en su conjunto, y relaciones entre tallo, raíces, hojas, etc, los cuales constituyen elementos que contribuyen a definir el valor comercial de las plantas ornamentales (A. Dibenedetto, comm. Personal).

Como ya fue mencionado anteriormente, la tolerancia a los metales puede tener su costo ecofisiológico, en términos de un menor crecimiento de los individuos. La detoxificación de los metales en las células suele tener un alto costo metabólico, por lo que las plantas que crecen en condiciones de estrés presentan normalmente mayores tasas de respiración, y menores tasas de asimilación neta y crecimiento (Baker, 1987; Lösch & Kölh, 1999). En este sentido existen evidencias de que los

metales acelerarían la senescencia (Maksymiec & Baszynski, 1996). Reducciones en el área foliar total por planta han sido reportados por Clemens (2001) y Singh, (2001), entre otros. Por ejemplo, Acevedo y col. (2005) observaron que el Cd disminuyó el número y tamaño de hojas de girasol (*Helianthus annuus L*), lo que provocó clorosis severa con aparición de manchas necróticas en las láminas de las hojas. Tripathi y col. 1999, por otro lado, encontraron que el área foliar y la biomasa de semillas de *Albizia lebbek* resultaron severamente afectadas con una dosis de 200 ppm de Cr (VI) en el suelo.

Finalmente, los metales podrían reducir (Saikkonen y col. 1998) y retrasar la floración (Korboulewsky y col. 2002; Brun y col. 2003). De acuerdo con Ouzounidou y col. (1997) la acción inhibitoria de los metales pesados sobre la elongación radical, altura de tallos y área foliar parecería deberse principalmente a aberraciones cromosómicas y divisiones celulares anormales. Por otro lado, en ocasiones repercute en otros procesos, como la reproducción, de manera que en situaciones de estrés por metales algunas plantas producen menor cantidad de estructuras reproductivas (Cox, 1988a, b). Los parámetros mencionados anteriormente son fundamentales al momento de seleccionar plantas ornamentales para ser utilizadas en fitorremediación; por lo tanto, es de interés estudiar los efectos de los metales sobre la calidad ornamental de estas especies. El objetivo de este capítulo fue cuantificar el efecto de los metales sobre la calidad ornamental de la especie *P. hortorum*. Como hipótesis se planteó que el aumento en la concentración de metales no afecta significativamente la calidad ornamental del cultivo, pero tiene efectos sobre el tiempo de producción.

## 6.2 Materiales y Métodos

### 6.2.1 Determinación de área foliar, área de flores, altura y diámetro de planta

Teniendo como base los experimentos descritos en el capítulo III, en diferentes momentos desde el comienzo de los mismos se realizaron determinaciones no destructivas de área foliar (se marcó con un lápiz el borde de la hoja sobre un papel de cuadrícula milimetrada, y contaron las cuadrículas de 1 cm<sup>2</sup>), área de flores (de igual forma que las hojas), altura (se determinó tomando la medida desde la base del tallo hasta el ápice del mismo) diámetro (se midió a 1 cm de la base del tallo) de planta, y otras características de calidad ornamental (Zubillaga & Lavado, 2001). El área foliar y de flores se determinaron a los 40, 80 y 120 días de comenzado el experimento; en cambio, diámetro y altura a los 40 y 120 días de comenzado el experimento.

### 6.2.2 Determinación de peso seco, relación raíz /parte aérea y TCR de las plantas

Una vez realizada la cosecha se cuantificó la producción de biomasa vegetal aérea y radical (peso seco). Además se calculó la relación raíz/parte aérea de las plantas en base al peso seco aéreo y radical de las mismas mediante la siguiente formula:

$$\text{Relación raíz/parte aérea} = \frac{\text{Peso seco raíces (g)}}{\text{Peso seco parte aérea (g)}}$$

Finalmente se calculó la TCR de las plantas correspondientes a cada tratamiento, en base a los pesos secos tal como fue indicado en el capítulo V.

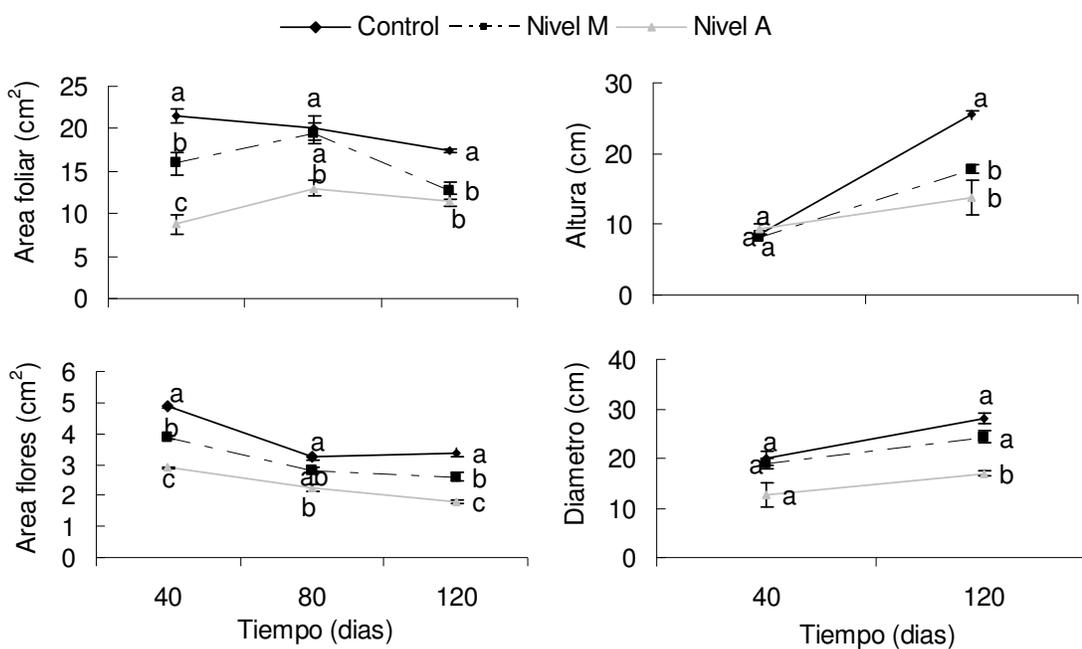
### 6.2.3 Análisis estadístico

A fin de evaluar los efectos sobre la calidad ornamental se realizaron análisis de varianza y pruebas de comparación de medias (Tukey) entre tratamientos por muestreo, utilizando un nivel de confianza del 95 %. Cuando en alguno de los tratamientos en alguna de las fecha de muestreo la producción de flores resulto inhibida, éste no se tuvo en cuenta para el análisis estadístico, debido a la falta de datos para realizar el mismo.

### 6.3 Resultados

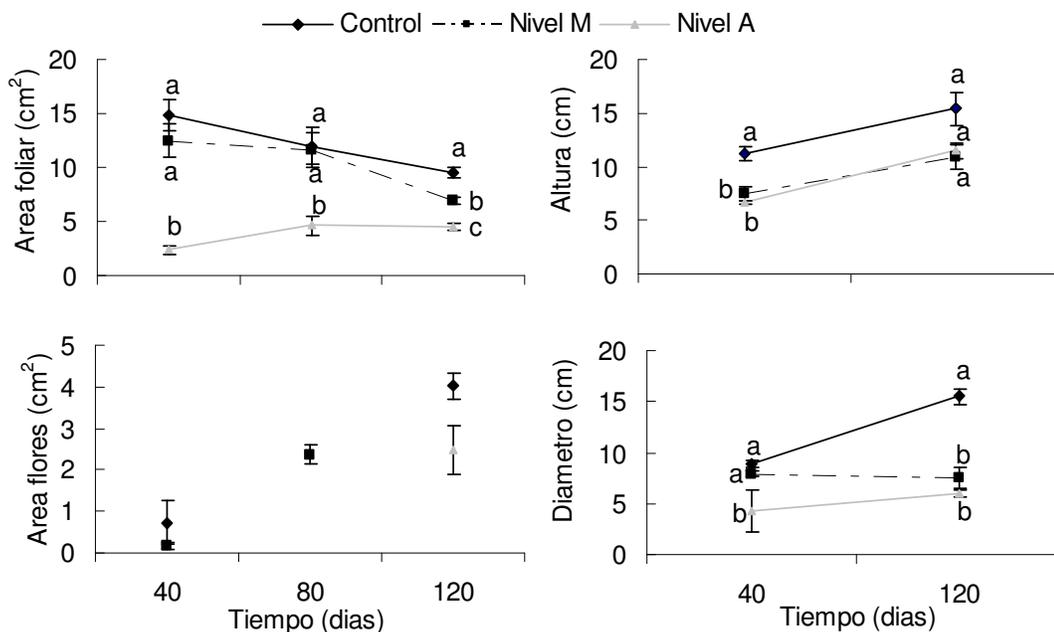
#### 6.3.1 Determinación de área foliar, área de flores, altura y diámetro de planta

El área foliar, área de flores, diámetro y altura de plantas fueron significativamente influenciadas por los 2 niveles de metales en el suelo (Figuras 6.1 y 6.2).



**Figura 6.1** Área foliar, área de flores, altura y diámetro de tallo del experimento 1 por tratamiento en función del momento de muestreo. Valores promedio  $\pm$  desvío estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

El efecto inhibitorio de los metales sobre el crecimiento de las plantas se hizo evidente por el decrecimiento observado en el área foliar de los tratamientos con metales respecto al control. En el experimento 2, los efectos sobre este parámetro fueron más severos que en el experimento 1, registrándose en la tercera fecha de muestreo diferencias significativas entre el nivel M y nivel A. Por otra parte, uno de los parámetros más afectados fue la producción de flores; en el experimento 1 (Figura 6.1) el área de flor siguió el orden control > nivel M > nivel A desde el comienzo de las mediciones. El experimento 2 (Figura 6.2), tuvo muy pobre producción de flores durante el transcurso del experimento, por lo que sólo se muestra la tendencia para las flores que existieron durante los muestreos.

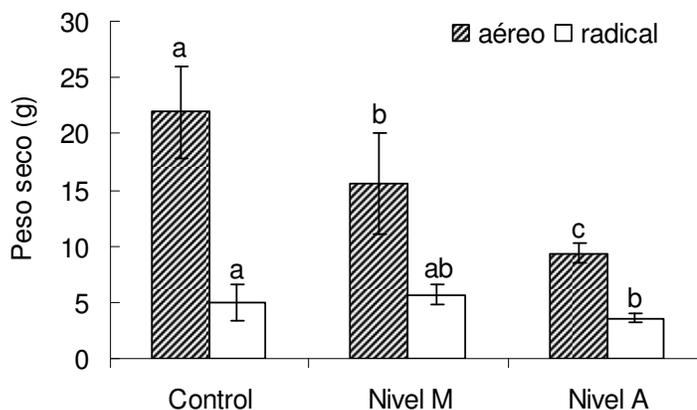


**Figura 6.2** Área foliar, área de flores, altura y diámetro de tallo del experimento 2 por tratamiento en función del momento de muestreo. Valores promedio  $\pm$  desvío estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

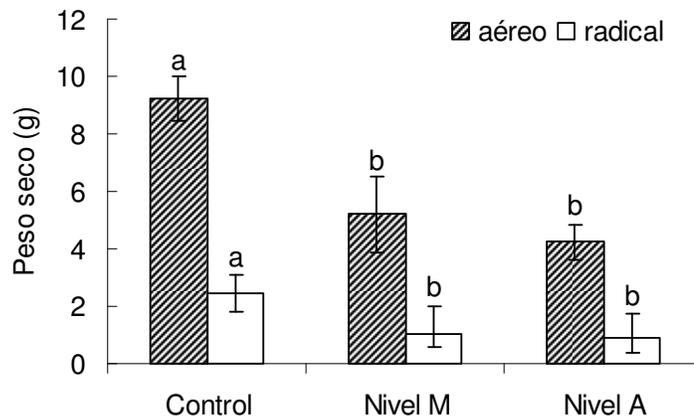
En el experimento 1 las variables diámetro y altura (Figura 6.1) mostraron diferencias significativas a partir del segundo muestreo, en el cual se comenzó a evidenciar una respuesta negativa sobre todo para la dosis más alta de metales. En el experimento 2 (Figura 6.2), en cambio, se encontraron diferencias significativas en diámetro y altura desde la primera fecha de muestreo. Sin embargo, al finalizar el experimento sólo se registraron diferencias significativas en el diámetro de estas plantas.

### 6.3.2 Determinación de peso seco, relación raíz /parte aérea y TCR de las plantas

Como era de esperar, por los resultados previos, en ambos experimentos, los tratamientos con metales resultaron en un decrecimiento del peso seco total por planta, resultando especialmente afectado el peso seco aéreo (Figura 6.3 y 6.4).

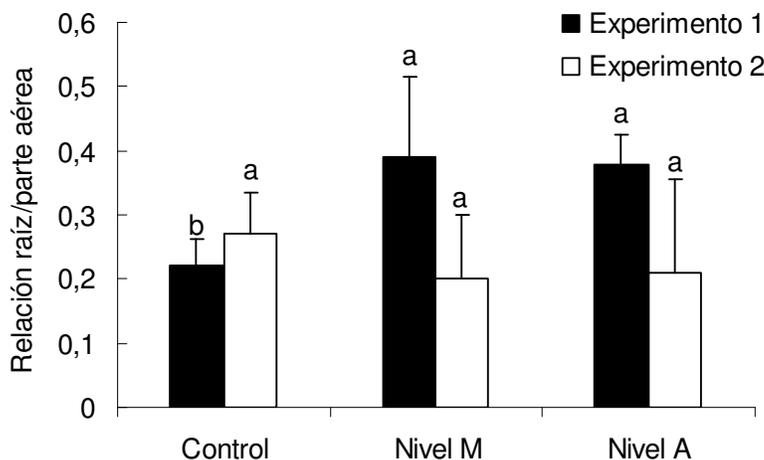


**Figura 6.3** Peso seco aéreo y radical experimento 1. Valores promedio  $\pm$  desvío estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 6.4** Peso seco aéreo y radical experimento 2. Valores promedio  $\pm$  desvío estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

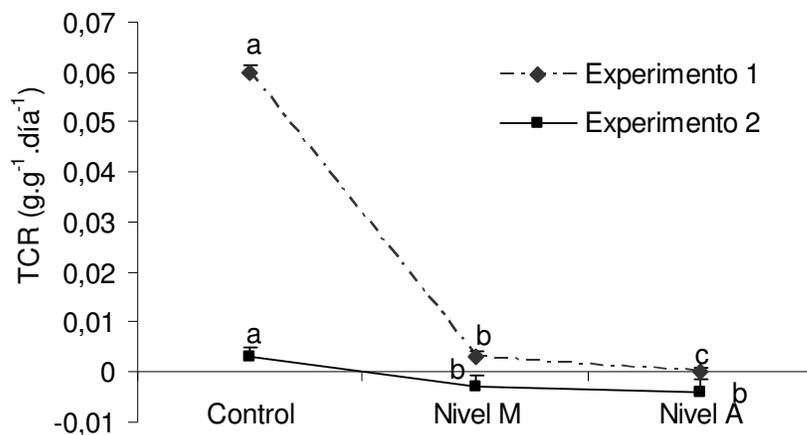
En la Figura 6.5 se muestra la relación raíz/parte aérea de ambos experimentos en función de los tratamientos.



**Figura 6.5** Relación raíz /parte aérea de los experimentos 1 y 2. Valores promedio  $\pm$  desvío estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

El valor de esta relación se incrementó significativamente ( $P < 0,05$ ) en el experimento 1, lo que significa que la planta sacrificó la acumulación de biomasa en los órganos aéreos a favor de su desvío hacia las raíces mostrando un comportamiento directamente proporcional a la concentración de metal en el suelo. En contraste en el experimento 2 no se encontraron diferencias significativas en esta relación; sin embargo puede verse que los tratamientos con metales presentan una relación levemente menor al control, indicando que en los mismos se afectó tanto el crecimiento aéreo como radical de las plantas.

En la Figura 6.6 se observa la TCR de los experimentos 1 y 2. En dicha figura se puede ver que en ambos experimentos las TCR de los tratamientos con metales fueron significativamente menores a los encontrados en los tratamientos control.

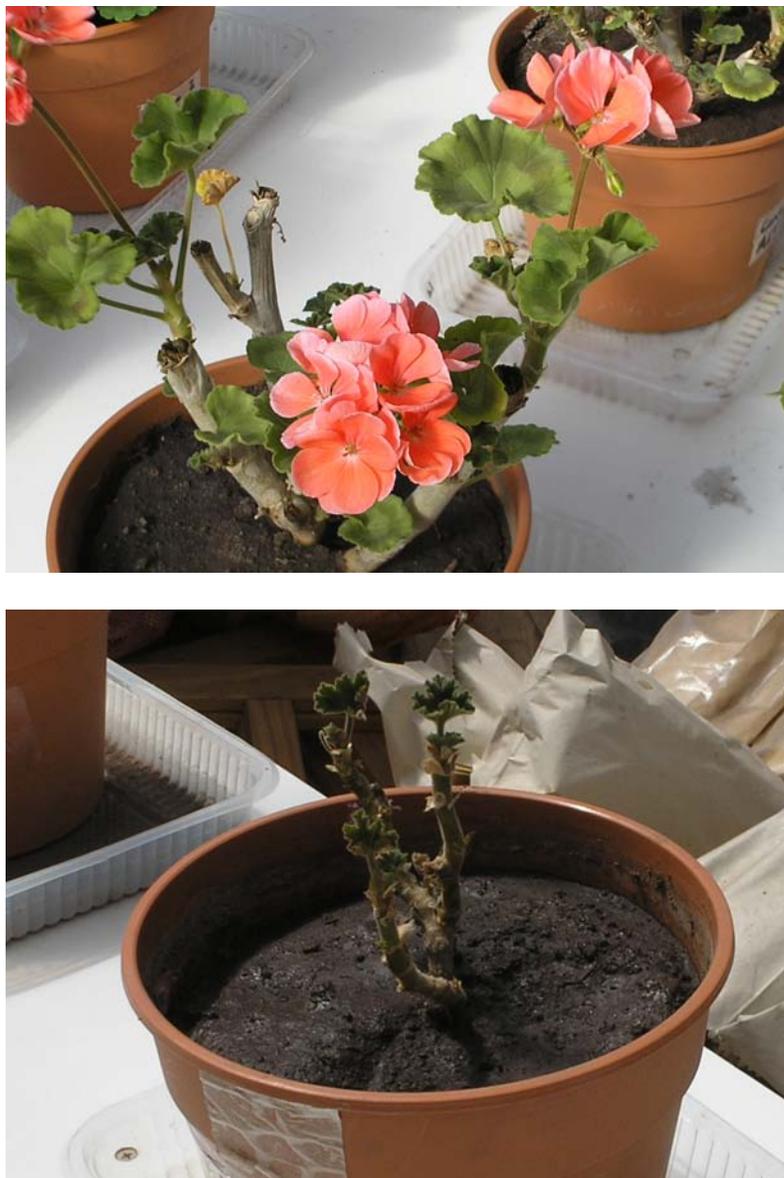


**Figura 6.6** Tasa de crecimiento relativo (TCR) de los experimentos 1 y 2. Valores promedio  $\pm$  desvío estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

En la figura 6.6 se observa que en el experimento 1 el tratamiento nivel A tuvo una tasa cercana a cero; sin embargo, en ambos niveles de metales en el suelo no se registraron tasas negativas de crecimiento. En el experimento 2, en cambio, la TCR fue negativa en ambos niveles de metales en suelo; una posible explicación podría residir en el hecho de que las plantas de este experimento sufrieron una gran pérdida de hojas durante el transcurso del mismo, las cuales no fueron contabilizadas para la medición de la biomasa vegetal final.



**Figura 6.7** Fotos tratamientos nivel M y nivel A respectivamente, experimento 1.



**Figura 6.8** Fotos tratamientos nivel M y nivel A respectivamente, experimento 2.

#### 6.4 Discusión

Es ampliamente conocido que la absorción y acumulación de metales en plantas produce variados efectos fitotóxicos en las mismas (Barceló y col. 1988; Sridhar y col. 2005). De acuerdo con nuestros resultados, la significativa reducción del área foliar sugeriría que los metales testeados han alcanzado concentraciones fitotóxicas a nivel de hoja (Gothberg y col. 2004). Dicha reducción del área foliar podría estar asociada con una mayor senescencia foliar en los tratamientos enriquecidos con metales, dado que las plantas de estos últimos sufrieron una fuerte reducción de la superficie aérea a pocos días de comenzado el experimento. En este sentido, Barcelo & Porschenrieder (1990) informaron que el estrés por metales pesados en plantas sensibles puede inducir una serie de eventos que llevan a la disminución de las

perdida de agua, por ejemplo mediante una reducción en el número y tamaño de hojas.

Uno de los parámetros mas afectados fue la producción de flores, especialmente en el experimento 2. Cabe señalar que si bien en ambos experimentos el crecimiento y desarrollo de flores fue afectado, las flores resultaron de aceptable calidad visual y color. De acuerdo con Tooke y col. (2005) el estrés por metales pesados causa retraso en la floración ya que la formación de flores esta directamente relacionada con las condiciones ambientales. En este sentido Saikkonen y col. (1998) informaron una reducción en el número de flores de *Potentilla anserine* en respuesta al tratamiento con una solución de  $200 \mu\text{g.g}^{-1}$  Cu y  $100 \mu\text{g.g}^{-1}$  Ni, pero no encontraron efecto alguno sobre la fecha de floración. Otros autores (Brun y col.2003; Ryser & Sauder, 2006), también encontraron un recambio mas lento de las hojas debido al retraso y reducción de la floración. Finalmente, se ha encontrado que el tiempo de antesis y la maduración de semillas de *Silene vulgaris* varía entre plantas que crecen en suelos con diferentes contenidos de metales pesados (Ernst & Nelissen, 2000).

En ambos experimentos los metales influenciaron negativamente el crecimiento en altura y diámetro de las plantas. El retraso en el crecimiento es una respuesta comúnmente observada en una amplia gama de plantas que crecen en suelos enriquecidos con metales (Baker & Walker, 1989). Varios autores (Hasnain & Sabri, 1997; Pasternak y col. 2005) han informado que los metales inhiben la elongación de raíces, parte aérea y tallos, y reducen el número y diámetro de los haces vasculares (Barceló & Poschenrieder, 1990). Los efectos adversos del Cr sobre la altura de planta y crecimiento de la parte aérea han sido informados por otros autores (Hanus & Tomas, 1993; Rout y col. 1997).

Los metales ejercieron efectos adversos tanto sobre el crecimiento aéreo como sobre el crecimiento radical de las plantas (Ernst y col. 1992; Ashmore 1997). Se ha demostrado que los efectos primarios de toxicidad por metales pesados se producen en las raíces, las que muestran una menor elongación (Marchner, 1986; Lambers y col.1998); Por otro lado, la gran disminución del peso seco aéreo sobre todo en el experimento 2, coincide con lo publicado por otros autores para varios metales (Krämer y col. 1996; Hajiboland, 2005). Es conocido que la relación entre las diferentes partes de una planta, raíces vs. parte aérea, por ejemplo, están determinadas genéticamente pero pueden ser modificadas por el ambiente; así, la relación raíz/parte aérea es un factor dependiente de la distribución de los fotoasimilados, cuya producción y distribución está supeditada a los estímulos ambientales (Rogers y col. 1996); también depende de la capacidad del vegetal para modificar la distribución de materia seca, de manera que le permita tolerar las condiciones adversas en que se desarrolla; es sabido que la relación raíz/tallo se incrementa en condiciones de estrés hídrico de modo de facilitar la absorción de agua y nutrientes (Lambers, 1998). El aumento de esta relación en el experimento 1 coincide con los resultados obtenidos por Larbi y col. (2002), quienes encontraron un incremento de la relación raíz/tallo de plantas de *Beta vulgaris* expuestas a Cd y Pb en hidroponía. En el experimento 2 esta relación se mantuvo similar entre tratamientos lo que indicaría que en este experimento resultó muy afectado además del peso aéreo, el peso radical. Esto concuerda con lo informado por Kukkola y col. (2000) quienes encontraron una marcada reducción en la asignación de biomasa a raíces de *P. silvestris* cuando fueron agregados conjuntamente Ni y Cu, en hidroponía. Las respuestas contrastantes en nuestros experimentos podrían estar asociadas a las diferentes combinaciones de metales, y también a las condiciones generales de crecimiento de cada experimento.

Finalmente, la TCR la cual indica la acumulación de biomasa presente, por unidad de biomasa producida y por unidad de tiempo, fue significativamente menor en los suelos enriquecidos con metales. Esta reducción en las TCR en los tratamientos con metales concuerda con los resultados de otros autores (Stratford y col. 1984; Haag-Kerwer y col. 1999). En el experimento 1 el nivel A tuvo una tasa cercana a cero; en el experimento 2 la TCR a ambos niveles de metales fue negativa, lo cual sugeriría que en ellos la proporción de biomasa disminuyó durante el ciclo de crecimiento debido a la mayor senescencia y muerte de hojas (Davidson & Campbell, 1984) registradas a lo largo del experimento. En este sentido, es sabido que los cambios morfológicos pueden contribuir a reducir las tasas de crecimiento de plantas expuestas a metales; de este modo, una alta proporción de biomasa foliar favorece altas tasas de crecimiento, mientras que una proporción elevada de biomasa radical correlaciona negativamente con la TCR (Reich y col. 1998; Antúnez y col. 2001).

## 6.5 Conclusiones

Nuestros datos indican que aún niveles medios de metales en los suelos puede influir no sólo sobre el crecimiento, sino sobre la calidad ornamental de las plantas de *P. hortorum*. Tanto el peso aéreo como radical se vieron afectados con las concentraciones crecientes de metales en el suelo, resultando especialmente afectados la formación de nuevas hojas y flores. Sin embargo, pese a los efectos negativos observados, las plantas fueron capaces de continuar su crecimiento y completar su ciclo biológico con producción de flores, sobre todo en el tratamiento nivel M.

***La hipótesis 6.1 no fue confirmada por los resultados obtenidos. En ambos experimentos la aplicación de dosis crecientes de metales causaron un decrecimiento significativo en varios de los parámetros ornamentales medidos; los efectos deletéreos fueron mas severos al pasar del nivel M al alto y con el tiempo de exposición. Uno de los parámetros más afectados fueron el área foliar y la producción de flores, siendo este último factor, precisamente de mayor importancia en la comercialización de estas plantas ornamentales.***

## ANEXO

### Tolerancia y capacidad de acumulación de seis metales, en tres especies del género *Pelargonium*

#### 1. Introducción

Como se mencionó en la introducción, los procesos industriales, la minería y otras actividades humanas han dado lugar a una considerable contaminación de los suelos con metales pesados y otros contaminantes en algunas áreas. La consecuente acumulación de estos metales en plantas vasculares provoca respuestas bioquímicas y fisiológicas significativas, modificando varios procesos metabólicos (MacFarlane y col. 2003). De acuerdo con Clijsters y col. (1999) clorosis en hojas y reducciones en la producción de biomasa son frecuentemente observadas en cultivos que crecen en suelos contaminados con niveles moderados de metales pesados.

Para la descontaminación del suelo están disponibles varias técnicas, pero la posibilidad de utilizar plantas para fitoextracción, ha recibido un interés considerable en los últimos años. La mayoría de las técnicas tradicionales son muy costosas, y pueden resultar en un deterioro de la calidad del suelo. Por otro lado, los estudios sobre fitoextracción se han centrado inicialmente en plantas hiperacumuladoras de metales (Blaylock & Huang, 2000), las cuales pueden tolerar altos niveles de ciertos metales en el suelo, y acumular 100-1000-veces los niveles normalmente acumulados por la mayoría de las especies, sin efectos adversos en su crecimiento (Reeves & Baker, 2000). Sin embargo, las especies hiperacumuladoras suelen ser pequeñas, poseen tasas de crecimiento bajas, y no poseen valor económico. Una mayor producción de biomasa vegetal puede compensar una capacidad relativamente baja de acumulación de metales, resultando en mayor acumulación y remoción de metales desde el suelo. Por lo tanto, la identificación de nuevas especies con mayor producción de biomasa, sumado a la habilidad para tolerar y acumular varios metales pueden ser una alternativa interesante, con varias ventajas adicionales (Perttu, 1999).

Además, la capacidad de las plantas para bioacumular metales varía según la especie vegetal y la naturaleza de los contaminantes; estas diferencias en la absorción de metales pueden ser atribuidas a la capacidad de retención del metal por el suelo y a la interacción planta-raíz-metal (Naidu y col. 2003). En este sentido, las reacciones químicas, que tienen lugar en el suelo, controlan el movimiento de los metales dentro del mismo y su absorción por las plantas (Tiller, 1989). Por ejemplo, la barrera suelo-planta limita la transmisión de Pb a la cadena alimenticia, ya sea por procesos de inmovilización química en el suelo (Bolan y col. 2003), o limitando el crecimiento de las plantas antes que el Pb alcance niveles tóxicos para el ser humano. Por otro lado, como fue mencionado en la introducción general las plantas no pueden acceder al "pool" total de metales presentes en el suelo, siendo los metales en la solución del suelo los que se encuentran disponibles para su absorción por las mismas (Marschner, 1986; Whitehead, 2000).

La mayor parte de los estudios de especies candidatas para remediación se basan en la interpretación de las concentraciones de metales en los tejidos de las plantas (Nanda-Kumar y col. 1995; Huang & Cunningham, 1996; Huang y col. 1997). Sin embargo, el uso del Factor de Bioconcentración (BCF) provee una mejor aproximación a fin de comparar la efectividad de las plantas en concentrar metales desde el suelo (Robinson y col. 1998; Audet & Charest, 2007). Se considera plantas hiperacumuladoras a aquellas que presentan un BCF > 1.0 (Cluis, 2004; Ghosh & Singh, 2005). Finalmente, en suelos contaminados por metales, tiene especial interés el análisis de nutrientes básicos en los tejidos de la planta, ya que concentraciones

elevadas de los primeros pueden interferir negativamente en la absorción y transporte de los segundos (Hagemeyer, 1999; Siedlecka y col. 2001). Por ejemplo, de acuerdo con Siedlecka (1995) los metales pesados pueden causar deficiencias de nutrientes y hasta cambiar las concentraciones de nutrientes básicos tales como nitrógeno y fósforo en los tejidos de las plantas.

Tras la identificación de especies de *Pelargonium* aromáticas tolerantes y capaces de acumular altas concentraciones de Cd, Ni (Dan y col. 2002) y Pb (KrishnaRaj y col. 2000; Arshad y col. 2008) en sus tejidos, otras especies de este género ameritan ser estudiadas con fines de fitorremediación. Por otro lado, es conocido que las especies vegetales e incluso, las variedades, difieren entre sí en su capacidad para absorber metales, acumularlos y tolerarlos (Alloway & Jackson, 1991; McNair y col. 2000; Krämer y col. 2000; Angelova y col. 2004). A partir del conocimiento de la variabilidad interespecífica planteamos la hipótesis de que la tolerancia y acumulación de niveles elevados de varios metales varía entre las distintas especies pertenecientes al género *Pelargonium*. Por lo tanto, los objetivos generales de este Anexo son evaluar la tolerancia de las tres especies del género sometidas al efecto simultáneo de 6 metales, analizando el suministro de metales desde el suelo, la acumulación de los mismos en planta, y sus efectos sobre la composición química de la planta. La idea subyacente es seleccionar la especie que presente mejor comportamiento, para estudios específicos.

## 2. Materiales y métodos

Se desarrollaron tres experimentos en invernáculo, utilizando un suelo cuya caracterización química y física ya fue indicada en el Cuadro 2.1 del capítulo II. Los tratamientos, consistieron en un suelo control, no contaminado y dos niveles de contaminación con metales (nivel M y A); los metales estudiados fueron Cd, Cu, Cr, Ni, Pb y Zn aplicados al suelo en forma de sales solubles en base a la técnica indicada en el capítulo II.

Los experimentos se llevaron a cabo en tres especies del género *Pelargonium*: malvón (*P. hortorum*), geranio (*P. peltatum*) y malva rosa o geranio limón (*P. graveolens*). Los primeros dos son ornamentales y el tercero aromático. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con 11 repeticiones por tratamiento en los casos de *P. hortorum* y *P. peltatum* y 3 repeticiones por tratamiento en el caso de *P. graveolens*; en esta última especie el escaso número de repeticiones se debió a dificultades para obtener plántulas de esta especie. Los experimentos se realizaron en macetas conteniendo 2 kg de suelo, y se utilizaron plantas homogéneas en tamaño y peso. Cada maceta constituyó una unidad experimental. Las plantas permanecieron en invernadero durante 16 semanas, momento en que se realizó la cosecha.

### 2.1 Determinación de peso seco aéreo y radical e Índice de tolerancia (TIN)

Las plantas pertenecientes a cada tratamiento fueron cosechadas en el mismo momento, lavadas cuidadosamente con agua destilada, y divididas en partes aéreas y radicales. Se procedió luego al secado en estufa hasta peso constante durante aproximadamente 72 horas, y se determinó el peso seco de la biomasa aérea y radical.

A fin de evaluar los efectos del estrés impuesto, se calculó la tolerancia de las especies ya que por tratarse de especies con un posible fin de remediación, la producción de materia seca es una de las características más importantes a tener en cuenta. Los pesos secos de las plantas creciendo en los suelos contaminados fueron

expresados como porcentaje del crecimiento en el suelo control a fin de determinar el índice de tolerancia de las mismas.

$$TIN = \frac{\text{Peso seco promedio plantas en suelo con metales}}{\text{Peso seco promedio plantas en suelo control}} * 100$$

## 2.2 Determinación de metales disponibles (DTPA), pH y conductividad eléctrica (CE)

En el suelo se determinaron además los metales disponibles, mediante el método del DTPA (Sparks, 1996); el mismo, se llevó a cabo agregando 20 ml de solución AB-DTPA (Bicarbonato de amonio-Ácido dietilenamino pentacético) a 10 g de suelo seco colocados en erlenmeyers de 125 ml; luego se procedió a agitar durante 15 minutos aproximadamente en agitador reciproco a 180 ciclos/minuto, y se filtró la solución resultante a través de papel Whatman nº 45; finalmente se determinaron los elementos de interés en el filtrado. Además se determinaron pH y conductividad eléctrica (CE) utilizando una relación suelo: agua 1:2,5.

## 2.3 Concentración de macro y micronutrientes en los tejidos las plantas y Factor de Bioconcentración (BCF)

Las plantas completas (parte aérea+raíces) fueron molidas a fin de realizar las determinaciones analíticas de los metales (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn) macro (N, P, K, Ca, Mg y Na) y dos micronutrientes (Fe y Mn) con las técnicas indicadas en el capítulo II. La concentración de metales se determinó mediante ICP-OES, Nitrógeno total por el método de Kjeldhal y fósforo por colorimetría de vanadomolibdato (Sparks y col. 1996).

Las 3 especies fueron también evaluadas en base a su habilidad para absorber metales de los suelos. Para tal fin fue calculado el BCF; este provee un índice sobre la habilidad de la plantas para acumular un metal en particular con respecto a su concentración en el sustrato del suelo (Zayed y col. 1998). El mismo fue calculado como:

$$\text{Factor de Bioconcentración} = \frac{\text{Concentración promedio de metales en planta (mg.kg}^{-1}\text{)}}{\text{Metales agregados al suelo (mg.kg}^{-1}\text{)}}$$

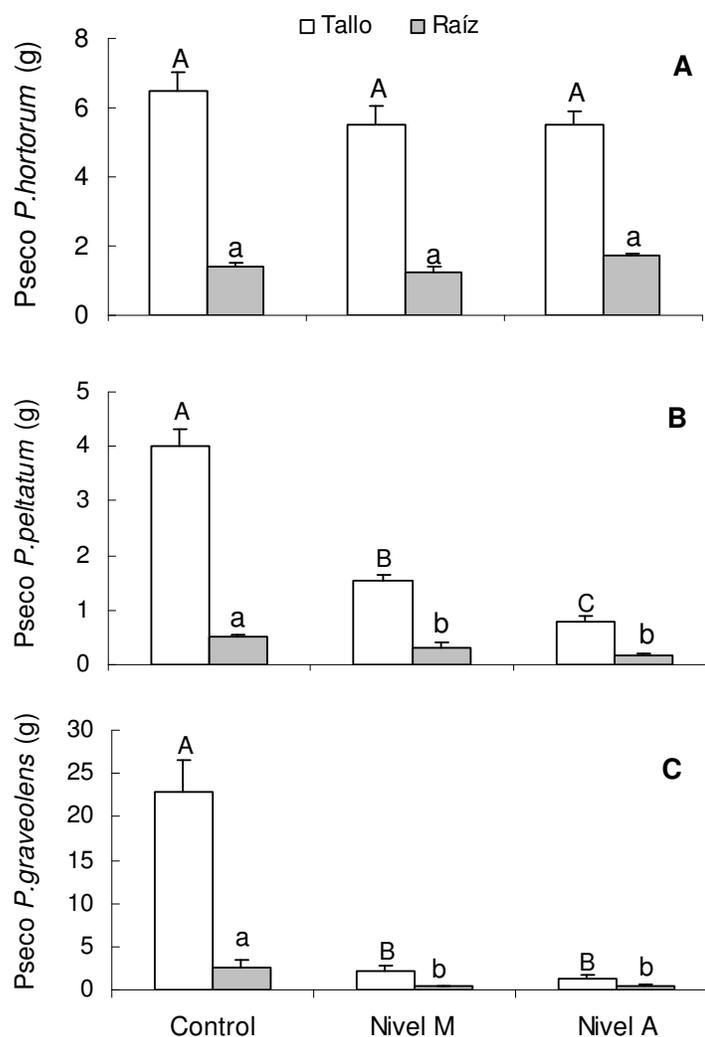
## 2.4 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza individuales para cada especie y variable estudiada mediante el programa Statistix 8.0. Los datos fueron analizados a través de ANOVA de una vía (One-way ANOVA) a fin de determinar diferencias significativas en biomasa, acumulación de metales, macro y micro nutrientes como resultado de los tratamientos, previa comprobación de homogeneidad de varianzas (test de Bartlett). Las diferencias entre medias de los tratamientos se compararon a través del test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 3. Resultados

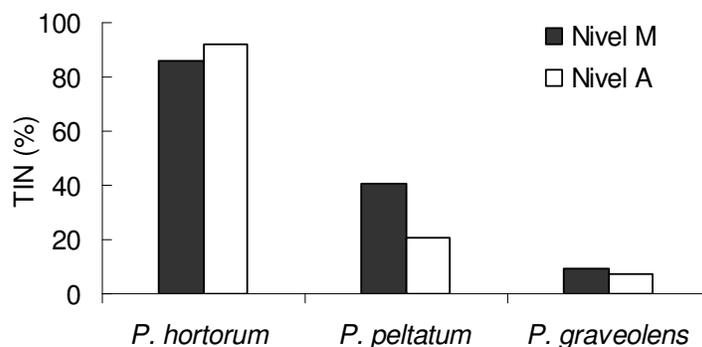
### 3.1 Determinación de peso seco aéreo y radical e Índice de tolerancia (TIN)

En la Figura A.1 se muestra el peso seco aéreo y radical de *P. hortorum*, *P. Peltatum* y *P. graveolens* por tratamiento. En el nivel A se comprometió seriamente el crecimiento vegetal a partir del tercer mes de experimento; por este motivo las plantas del nivel A se cosecharon un mes antes de finalizar el experimento. En el caso de *P. hortorum* (Figura A.1 A) tanto la biomasa aérea como la radical fueron poco afectadas con los niveles crecientes de metales en el suelo; en contraste, en los casos *P. Peltatum* y *P. graveolens* la producción de biomasa fue muy afectada para ambos niveles de metales en el suelo (Figuras A.1 B y C). Especialmente *P. graveolens* sufrió una fuerte reducción del crecimiento aéreo y radical en ambos niveles de metales en el suelo.



**Figura A.1** Peso seco aéreo y radical de *P. hortorum*, *P. Peltatum* y *P. graveolens* en el suelo control, nivel M y nivel A. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

Los 2 tratamientos con agregado de metales afectaron significativamente el normal crecimiento de las plantas, incrementándose el efecto tóxico con la concentración aplicada. Las tres especies muestran un índice de tolerancia menor al 100 % en los tratamientos con metales (Figura A.2).



**Figura A.2** Índice de tolerancia (TIN) de *P. hortorum*, *P. Peltatum* y *P. graveolens* en los tratamientos nivel M y A.

*P. hortorum* mostró un índice superior a las otras 2 especies, incluso en el tratamiento concentración alta. *P. peltatum* resulto afectada sobre todo a la concentración más alta de metales, mientras que *P. graveolens* fue severamente a ambas concentraciones. En promedio los suelos enriquecidos con metales causaron un 75% de reducción en la biomasa total de *P. peltatum* y *P. graveolens*

### 3.2 Determinación de metales disponibles (DTPA), pH y conductividad eléctrica (CE)

En el Cuadro A.1 se muestran los niveles de metales disponibles luego de la estabilización del suelo; los mismos fueron bajos y dentro de valores normales en el suelo control (Lavado y col. 2004), y aumentaron a medida que aumentó el nivel de metales en el suelo, excepto en los casos de Cd, Pb y Zn. Los niveles crecientes de metales aumentaron en forma significativa los metales asimilables en el nivel M como en el nivel A (Cuadro A.1). Los contenidos biodisponibles fueron en general relativamente altos en relación al contenido total aplicado. La disponibilidad y movilidad de los metales aplicados en el nivel M siguió el orden Zn > Ni > Cu > Pb > Cd > Cr. Este patrón cambió en el nivel A siendo Zn > Ni > Cu > Cd > Pb > Cr.

**Cuadro A.1** Concentraciones promedio de metales extraídos con DTPA en el suelo (mg/kg). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

Concentración de metal (mg/kg)					
Cu	Pb	Zn	Cd	Cr	Ni
5,8± 0,0c	1,3± 0,2b	4,7± 0,3b	0,1± 0,0b	ND (LD=2,0)	1,2± 0,0c
123,3± 7,5b	94,2± 48,7a	248,0± 6,2a	9,9± 0,5a	61,9± 16,4b	138,2± 8,9b
170,4± 21,4a	49,2± 32,4a	248,5± 39,4a	11,6± 0,5a	64,3± 19,0a	187,8± 16,3a

ND (no detectado) y LD (valor del límite de detección).

En el Cuadro A.2 se muestra como varía el pH y la CE en los suelos control, nivel M y nivel alto. Como resultado de la aplicación de sales de metales, en los suelos enriquecidos con metales se observó una leve disminución del pH y un aumento en la conductividad eléctrica. Esto coincide con lo encontrado posteriormente y presentado en el capítulo IV.

**Cuadro A.2** pH y CE ( $\text{ds.m}^{-1}$ ) de los suelos por tratamiento. Promedios  $\pm$  desvío estándar.

Tratamiento	pH	CE ( $\text{ds.m}^{-1}$ )
Control	5.5 $\pm$ 0.06	0.3 $\pm$ 0.01
Nivel M	4.7 $\pm$ 0.21	1.7 $\pm$ 0.07
Nivel A	4.6 $\pm$ 0.05	1.7 $\pm$ 0.04

### 3.3 Concentración de macro y micronutrientes en los tejidos las plantas y Factor de Bioconcentración (BCF)

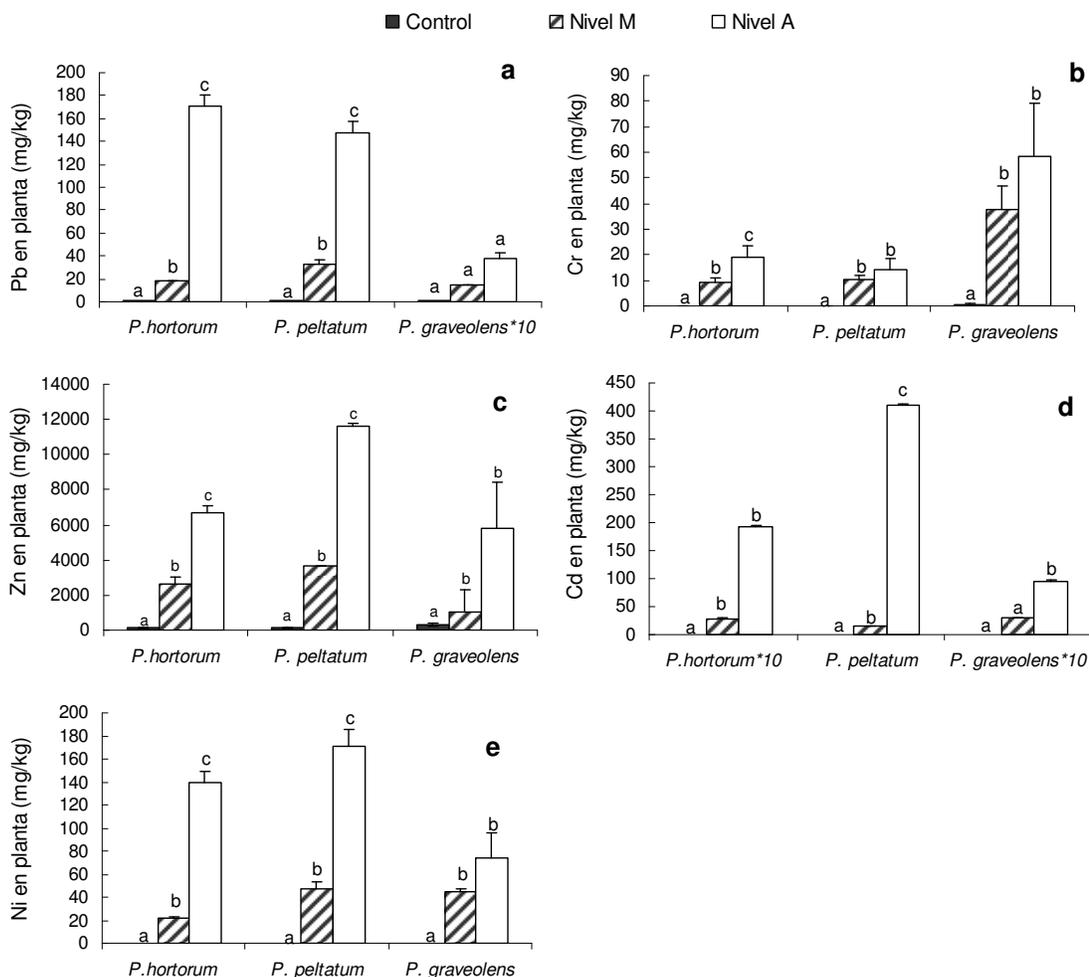
En el Cuadro A.3 se observa como varía la composición química de las plantas enteras de *P. hortorum*, *P. Peltatum* y *P. graveolens* en los tratamientos control, nivel M y nivel A.

**Cuadro A.3** Concentración de macro y micronutrientes en plantas enteras por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

Tratamiento	N	P	K	Ca	Mg	Na	Mn	Fe
	%	%	%	%	%	%	ppm	ppm
<b><i>P. hortorum</i></b>								
Control	1,4c	0,2c	1,8b	2,6b	0,1c	0,2b	156,7a	117,8b
Nivel M	1,6b	0,3b	2,0ab	3,4a	0,5b	0,3a	216,0a	65,7c
Nivel A	2,0a	0,6a	2,1a	3,7a	0,6a	0,3a	250,0a	162,0a
<b><i>P. peltatum</i></b>								
Control	1,5c	0,2b	1,8ab	2,3c	0,2c	0,2b	200,0b	114,5c
Nivel M	1,8b	0,3a	2,0a	3,4b	0,6b	0,4a	207,0ab	96,0b
Nivel A	2,3a	0,4a	2,1ba	5,2a	0,7a	0,4a	233,0a	125,9a
<b><i>P. graveolens</i></b>								
Control	1,5a	0,2a	1,4a	2,3a	0,1a	0,3a	537,3a	123,7a
Nivel M	1,5a	0,2a	2,0a	2,0a	0,1a	0,2a	393,3a	186,2b
Nivel A	1,4a	0,2a	2,0a	1,5a	0,1a	1,5a	266,3a	132,4b

En el caso de *P. hortorum*, *P. Peltatum*, las concentraciones de nutrientes se incrementaron significativamente a medida que se incremento la concentración de metales en suelo. *P. graveolens*, en cambio, no mostró cambios importantes en relación a los nutrientes pese a las concentraciones crecientes de metales en el suelo.

En la Figura A.3 se muestra la concentración promedio de metales en las 3 especies. En ella se observa que en general la concentración de metales en las plantas se incrementó a medida que aumentó la concentración de metales aplicada al suelo. La excepción fue Cu, el cual se encontró dentro del rango normal en las 3 especies.



**Figura A.3** Concentración promedio  $\pm$  desvío estándar de metales en plantas enteras (mg/kg) por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. \*Concentración en planta x 10.

En el Cuadro A.4 se muestra el BCF para las 3 especies. Este da una idea de la movilidad de los metales aplicados al suelo.

**Cuadro A.4** Factores de Bioconcentración para *P. hortorum*, *P. Peltatum* y *P. graveolens* en función de los tratamientos.

Metal	<i>P. hortorum</i>			<i>P. peltatum</i>			<i>P. graveolens</i>		
	Control	Nivel M	Nivel A	Control	Nivel M	Nivel A	Control	Nivel M	Nivel A
Pb	0,08	0,03	0,14	0,08	0,06	0,12	0,08	0,00	0,00
Zn	2,59	6,12	6,42	2,33	8,56	11,14	5,76	2,41	5,57
Cu	0,38	0,04	0,02	0,38	0,04	0,02	0,38	0,04	0,02
Cr	0,04	0,02	0,02	0,04	0,03	0,02	0,12	0,09	0,07
Cd	0,30	0,37	2,50	0,10	1,92	26,15	0,31	0,38	0,60
Ni	0,03	0,20	0,59	0,03	0,45	0,72	0,04	0,41	0,31

Estos coeficientes fueron bajos para Cr, Cu, Ni y Pb y relativamente altos para Cd y Zn especialmente en los casos de *P. hortorum* y *P. peltatum*. En general los valores de este coeficiente se incrementaron para Cd, Ni y Zn al pasar del nivel M al

nivel A. Cabe destacar que *P. peltatum* registro un incremento muy importante sobre todo en el caso de Cd el cual paso de tener un BCF de 1,92 en el nivel M a 26,15 en el nivel A.



**Figura A.4** Fotos *P. hortorum* tratamientos control, nivel M y nivel A respectivamente.



**Figura A.5** Fotos *P. peltatum* tratamientos control, nivel M y nivel A respectivamente.



**Figura A.6** Fotos *P. graveolens* tratamientos control, nivel M y nivel A respectivamente.

#### 4. Discusión

En los tres experimentos en general la biomasa aérea fue más afectada que la biomasa de raíces. Es conocido que los tejidos aéreos son más sensibles a la toxicidad por metales pesados que los tejidos de la raíz (Kahle, 1993; Lan y col. 1998). Las plantas desarrollaron síntomas de fitotoxicidad, especialmente en el nivel A; estos síntomas se manifestaron como manchas cloróticas y necróticas, senescencia temprana de las hojas maduras, y menor número y tamaño de las flores y las hojas (fenómeno no cuantificado). La inhibición del crecimiento y reducción en la producción de biomasa son respuestas comunes de las plantas superiores ante la toxicidad por metales pesados (Ouariti y col. 1997; Hadad y col. 2007). Por ejemplo, Nedhi y col (1990) encontraron que Ni retrasó significativamente la germinación, e inhibió el crecimiento y producción de materia seca en plantas de maíz. Por otro lado, una menor vida útil de las raíces, debido a la exposición a metales tóxicos, podría actuar incrementando la asignación de carbohidratos al sistema radical (Ulrich, 1985) lo cual podría, eventualmente, reducir el crecimiento del tallo (Gussarsson, 1994).

El pH del suelo es el principal factor que condiciona el proceso de adsorción de los metales en el suelo, su actividad y disponibilidad (Alloway, 1995; Houba y col. 1996). La disminución en el pH con respecto al suelo control suele atribuirse a reacciones de hidrólisis y a la adsorción de los metales sobre los minerales del suelo. Estas 2 reacciones liberan  $H^+$  en solución (McBride, 1994). Los nitratos, cloruros y sulfatos presentes en las sales de metales no sufren reacciones de hidrólisis, por lo que no tendrían influencia sobre estos efectos de acidificación, aunque tendrían influencia sobre los aumentos de CE registrados; sin embargo en ningún caso los valores de CE excedieron los límites de tolerancia en especies sensibles.

Es conocido que los metales pesados adicionados a los suelos se redistribuyen y reparten lentamente entre los distintos componentes de la fase sólida. Dicha

redistribución se caracteriza por una rápida retención inicial y posteriores reacciones lentas, dependiendo de las especies del metal, propiedades del suelo, nivel aplicado y tiempo (Han y col. 2003). Nuestros resultados muestran que en general se observó un aumento de la fracción lábil a medida que se incremento la concentración de metales en el suelo; sin embargo, Cd, Pb y Zn cambiaron muy poco su disponibilidad al pasar del nivel M al alto, por lo que la solubilidad de estos 3 elementos parecería ser menos dependiente de la concentración aplicada. Por otro lado, en concordancia con lo encontrado en el capítulo III, Cd, Zn y Ni fueron los elementos más lábiles, mostrando que son potencialmente más biodisponibles, y Pb y Cr fueron los menos biodisponibles. Las mayores disponibilidades de Cd, Zn y Ni pueden ser el resultado de la creciente saturación de los sitios de intercambio a medida que aumenta la concentración de metales en el suelo. Además, es conocido que la disponibilidad de los metales para las plantas depende, entre otros factores, de la presencia simultanea de varios metales en el suelo (Ernst & Nelissen, 2000). Nuestros resultados con respecto a Cr coinciden con datos de otros autores (Maiz y col. 1997) quienes también encontraron que en suelos urbanos de áreas industriales de Atenas (Grecia) Cr fue el elemento con menor disponibilidad en comparación con Cu, Pb y Zn.

Comparando nuestros resultados con datos de la bibliografía sobre estas especies (Mills & Benton Jones 1996; Hamrick 2003), en las 3 algunos nutrientes estuvieron por debajo de las concentraciones consideradas adecuadas para el normal crecimiento (N, P, K), otros (Ca) en exceso, y otros (Fe, Na y Mg) dentro del rango considerado normal; por otro lado, Mn se encontró debajo del rango considerado normal para *P. hortorum* y *P. peltatum* y en exceso en el caso de *P. graveolens* (Mn). Los valores encontrados para algunos nutrientes pueden estar relacionados con interacciones con los metales aplicados al suelo; en este sentido se conoce que algunos metales pesados, pueden influenciar significativamente la absorción y translocación de nutrientes en plantas (Stoyanova & Doncheva, 2002; Dube y col. 2003; Sinha y col. 2006). Por ejemplo, la interacción del Cd con elementos esenciales causa desordenes fisiológicos y cambios en el contenido de nutrientes de las plantas, además de retrasos en el crecimiento y menor rendimiento (Sandallo y col. 2001; Mazen, 2004). Otros autores encontraron que Pb compite con cationes divalentes para el transporte en raíces en plantas de arroz (Kim y col. 2002) y col (Sinha y col. 2006). El Cr, debido a su similitud estructural con algunos elementos esenciales, puede afectar la nutrición mineral de las plantas en un modo complejo (Barcelo y col. 1985). Por otra parte, se sabe que el transporte de Cr es un mecanismo activo que involucra "carriers" de aniones esenciales como el sulfato (Cervantes y col. 2001). Por ejemplo Chatterjee y Chatterjee (2000) encontraron en plantas de coliflor que un exceso de Cr (0,5 mM) causo una disminución en la concentración de Fe y afecto la translocación a parte aérea de P, S, Mn, Zn y Cu. Por lo tanto, un desbalance de nutrientes podría ser síntoma de toxicidad por metales pesados (Yadav y col. 2009).

En general, la concentración de metales en las plantas dependió del tipo de metal y de la especie vegetal; las concentraciones de los metales en el tratamiento control se encontraron dentro de los rangos normales en plantas (Alloway 1995; Kabata-Pendias & Pendias, 2000). Las concentraciones de los metales en las tres especies fueron mayores en los suelos enriquecidos con metales, con respecto a las plantas creciendo en el suelo control. Con base en las concentraciones de metales consideradas como normales en plantas, Kabata-Pendias & Pendias (2000) propusieron los siguientes rango de valores críticos en plantas: 5–30 mg kg<sup>-1</sup> (Cd y Cr), 20–100 mg kg<sup>-1</sup> (Cu), 10–100 mg kg<sup>-1</sup> (Ni), 20–300 mg kg<sup>-1</sup> (Pb) y 100–400 mg kg<sup>-1</sup> (Zn). Por tanto, estas plantas ornamentales acumularon altas concentraciones de todos los metales excepto Cu. Las tres especies acumularon Zn en mayor proporción con respecto a los otros elementos, y en contraste Cu en menor proporción. Esto último podría ser resultado de una interacción antagónica entre Cu y Zn (Adriano,

2001) o de interacciones Cu-materia orgánica (Quia y col. 2003), analizadas en el Capítulo III. En general, la acumulación de los metales restantes fue variable entre especies, siendo Ni acumulado en las tres, mientras que Pb y Cd resultaron más acumulados en *P. hortorum* y *P. peltatum*. Esto contrasta con los resultados hallados por otros autores (KrishnaRaj y col. 2000; Dan y col. 2002) quienes encontraron hipertolerancia a Cd, Pb y Ni en plantas de geranio con esencias. Cromo fue tomado por las 3 especies mostrando la mayor concentración en los tejidos de *P. graveolens*; normalmente, el Cr interfiere con diversos procesos metabólicos, causando toxicidad para las plantas, las cuales exhiben un crecimiento radicular reducido y menor biomasa, clorosis, efectos perjudiciales en la fotosíntesis, retraso del crecimiento pudiendo finalizar con la muerte de las mismas (McGrath, 1982; Gardea-Torresdey y col. 2004).

En general los valores de BCF fueron bajos y dentro de los órdenes de magnitud informados por Alloway (1995) en las tres especies, excepto para Zn y Cd, confirmando la mayor movilidad de estos elementos especialmente en las plantas de *P. hortorum* y *P. peltatum*. El incremento registrado en el BCF para Cd, Ni y Zn sobre todo en los casos de *P. hortorum* y *P. peltatum* al pasar del nivel M al alto podría explicarse por los mayores porcentajes de fracciones biodisponibles a medida que aumenta la concentración de metales en suelo (Kabata-Pendias & Pendias, 2000). *Pelargonium graveolens*, en cambio, además de disminuir su BCF en el caso de Ni al pasar del nivel M al alto, presentó valores de BCF inferiores a las otras 2 especies. En este sentido, *Pelargonium graveolens* se comportaría como la mayor parte de las especies que toleran la presencia de metales restringiendo su entrada en la raíz y su transporte a los tejidos fotosintéticos (Baker, 1981).

## 5. Conclusiones

Nuestros resultados muestran que existe variación entre las especies del género *Pelargonium* estudiadas, en relación con la producción de biomasa y concentración de metales en planta entera. Algunas especies de *Pelargonium* acumularon selectivamente un metal con respecto a otros. Por otra parte, de acuerdo con los resultados, los metales influyeron en la nutrición mineral de las plantas, especialmente en lo que respecta a N, P y K. La mejor respuesta en el crecimiento se obtuvo con *P. hortorum*, en comparación con *P. peltatum* y *P. graveolens*. De entre las 3 especies *P. graveolens* presentó menor potencial de acumulación de 5 de los metales aplicados. *P. hortorum* fue la especie menos afectada a nivel producción de biomasa aérea y radical y, aparentemente a nivel calidad ornamental y, por tanto, es la más promisoría. Si bien *P. hortorum* y *P. peltatum* mostraron similar potencial de acumulación de metales, *P. hortorum* mostró mayor producción de biomasa por lo que la extracción efectiva fue mayor.

*Nuestra hipótesis acerca del uso de especies del género Pelargonium, distintas a las indicadas por la bibliografía, en suelos enriquecidos con metales es aceptada ya que P. hortorum acumuló los metales manteniendo relativamente estable su biomasa. Por este motivo se sugiere a P. hortorum como candidata potencial para su ulterior estudio.*

## CAPÍTULO VII

### Discusión y conclusiones generales

Los metales pesados, como cadmio, cobre, plomo, cromo, zinc y níquel son importantes contaminantes del medio ambiente, especialmente en zonas con alta presión antropogénica (United States Environmental Protection Agency, 1997). La contaminación de suelos y aguas con metales pesados es un importante problema ambiental que crece día a día en el mundo; en el país existen diversos sitios contaminados por metales pesados, comúnmente en ambientes periurbanos, aunque existen pocos datos locales precisos sobre el tema (Lavado y col. 1998; Lavado y col. 1999; Lavado y col. 2004; Lavado y col. 2006b; Reyzaal y col. 2000); por lo tanto hasta la fecha son escasos los estudios realizados para la remediación de estos sitios.

Los métodos convencionales de remediación de suelos contaminados por metales pesados son complejos y muy caros (Abouloos y col. 2006). Esto llevó a la búsqueda de nuevas estrategias de remediación, entre ellas la fitorremediación, la cual se caracteriza por ser una forma ecológica, segura y barata para remover los contaminantes; además es estéticamente agradable, produce mínimo disturbio del medioambiente y posee buena aceptación pública (Raskin & Ensley, 2000; Morikawa & Erkin, 2003). La idea de utilizar plantas para reducir la carga de metales de suelos contaminados provino del descubrimiento de diferentes plantas silvestres, a menudo endémicas de suelos naturalmente metalíferos, las cuales acumulaban altas concentraciones de metales en su follaje (Raskin y col. 1997). Las investigaciones iniciales con el género *Pelargonium* realizadas con soluciones nutritivas demostraron la hipertolerancia de plantas de una especie de geranio (*Pelargonium sp.* "Frensham"), las cuales fueron capaces de extraer y almacenar en sus raíces y tallos grandes cantidades de Pb, Cd y Ni (Saxena y col. 1999; KrishnaRaj y col. 2000; Dan y col. 2002). Investigaciones más recientes en condiciones de campo, con varios cultivares de *Pelargonium* aromáticos mostraron que tres cultivares resultaron ser hiperacumuladores de Pb (Arshad y col. 2008).

A partir de las posibilidades potenciales de especies de este género, en esta tesis se desarrollaron varios objetivos con el fin de develar una serie de incógnitas enumeradas en el capítulo I. El presente capítulo está constituido por tres secciones. En la primera se revisan los objetivos y se hace una síntesis de los principales resultados alcanzados; en la segunda se contestan las preguntas que subyacen al objetivo general de esta tesis; finalmente en la tercera, se discuten las contribuciones al avance del conocimiento y las potenciales líneas de investigación a futuro.

#### 7.1 Síntesis de los resultados principales

##### **\*Tolerancia y capacidad de acumulación de seis metales, en tres especies del género *Pelargonium***

Se desarrollaron tres experimentos preliminares en invernáculo a fin de seleccionar una especie del género *Pelargonium*. Esto se describe en el Anexo. Los tratamientos, consistieron en un suelo control, no contaminado y no enriquecido con metales y dos niveles de enriquecimiento del suelo: nivel medio (M) y nivel alto (A) con 6 metales (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn). Los experimentos se llevaron a cabo en tres especies: Malvón (*P. hortorum*), Geranio (*P. peltatum*) y Malva rosa o Geranio limón (*P. graveolens*). Los objetivos generales fueron evaluar la tolerancia de las tres especies sometidas al efecto simultáneo de 6 metales, analizando el suministro de metales desde el suelo, la acumulación de los mismos en planta, y sus efectos sobre la composición química de las mismas. Se determinó el peso seco aéreo y radical, y el

TIN de las 3 especies; en suelo se determinaron metales disponibles (DTPA), pH y conductividad eléctrica (CE) y en plantas enteras concentración de macro y micronutrientes y el BCF. En el caso de *P. hortorum* tanto la biomasa aérea como la radical fueron poco afectadas con los niveles crecientes de metales en el suelo; en contraste, en *P. peltatum* y *P. graveolens* la producción de biomasa fue muy afectada para ambos niveles de metales en el suelo. Los niveles de metales disponibles fueron bajos en el suelo control, y aumentaron a medida que aumentó el nivel de metales en el suelo, excepto en los casos de Cd, Pb y Zn. Las tres especies mostraron un TIN menor al 100 % en los tratamientos con metales, aunque *P. hortorum* mostró un índice superior a las otras 2 especies, incluso en el tratamiento concentración alta. En las 3 especies algunos nutrientes estuvieron por debajo de las concentraciones consideradas adecuadas para el crecimiento (N, P, K), otros (Ca) en exceso, y otros (Fe, Na y Mg) dentro del rango considerado normal. En el caso de los metales, en general la concentración en las plantas se incrementó a medida que aumentó el nivel aplicado al suelo. La excepción fue Cu, el cual se encontró dentro del rango normal en las 3 especies. En general los valores de BCF fueron bajos, excepto para Zn y Cd, confirmando la mayor movilidad de estos elementos especialmente en las plantas de *P. hortorum* y *P. peltatum*. En base a los resultados *P. hortorum* fue la especie menos afectada a nivel producción de biomasa aérea y radical y, aparentemente a nivel calidad ornamental y, por tanto, fue la especie utilizada de aquí en adelante en todos los experimentos.

**\*Extracción de metales de las fracciones químicas y físicas del suelo y acumulación en órganos de *P. hortorum***

En el capítulo III los objetivos fueron investigar en que órgano de la especie estudiada se produce la mayor acumulación de los metales estudiados, y establecer cuales son las formas químicas y físicas del suelo a partir de las cuales esta especie extrae los metales. Para tal fin se realizaron 2 experimentos con 2 grupos de metales separadamente (experimento 1: Cu, Zn, Pb; experimento 2: Cd, Cr, Ni); en ellos se realizaron determinaciones de metales en raíces, tallos, hojas y flores; en el suelo se realizó el fraccionamiento químico y físico, y se intentó establecer correlaciones entre la concentración de metales en los órganos de *P. hortorum* y la concentración en las fracciones químicas y físicas. Los resultados muestran que, en líneas generales, la acumulación de metales fue máxima en las raíces y decreció en el siguiente orden: tallos > hojas > flores. Cadmio, Cr y Ni fueron los elementos con menor translocación a hojas y flores. La concentración de todos los metales aumentó sobre todo en raíces y tallos al pasar del nivel medio al alto. Los resultados obtenidos mediante el fraccionamiento secuencial del suelo mostraron que en los suelos enriquecidos con metales hubo una redistribución e incremento de los mismos en las diferentes fracciones; en el suelo control la fracción residual es la predominante para todos los metales, mientras que en los suelos enriquecidos con metales se observó un incremento generalizado en las fracciones más disponibles con respecto a la fracción residual. Cadmio, Ni y Zn fueron los elementos más lábiles, mostrando que son potencialmente más biodisponibles, mientras que Cr y Pb fueron los metales menos lábiles, con un alto porcentaje asociado a las fracciones unidas a carbonatos y residual, respectivamente. Desde el punto de vista físico, en general, los metales se asociaron principalmente a la fracción arcilla. La única excepción fue Pb, el cual se asoció en mayor proporción a la fracción limo ( $p < 0,05$ ). Los resultados de la fracción arena reflejan claramente que presenta baja capacidad para adsorber metales. En general la absorción de los metales por parte de *P. hortorum* estuvo asociada principalmente a la fracciones soluble e intercambiable, unida a materia orgánica y unida a carbonatos, ( $P < 0,05$ ) y en menor medida con la fracción residual. En este último caso se encuentran Cu y Ni en hojas, Pb en tallos y hojas y Cd y Cr en los tres órganos. A diferencia de los demás elementos, Cr presentó una correlación estadísticamente significativa especialmente con la fracción IV y con la fracción II. En

cuanto a las fracciones físicas casi todos los metales mostraron una correlación significativa y positiva con el contenido de metales en las fracciones finas del suelo (arcillas y limos); las excepciones fueron Cu y Zn en raíces, y Pb en tallos los cuales correlacionaron con el contenido de metales en la fracción arena.

#### **\*Extracción de metales desde la rizosfera y el volumen del suelo e interacciones entre metales**

Los objetivos del capítulo IV fueron evaluar la relación entre los metales acumulados en plantas de *P. hortorum* y los metales provenientes de la rizosfera o del volumen de suelo, y por otro lado estimar las diferencias en la absorción de cada metal cuando se encuentra solo o cuando se encuentra en conjunto con otros. Los metales utilizados fueron Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn agregados al suelo en aplicación individual (un metal), ternaria (tres metales) y múltiple (6 metales). La aplicación en forma ternaria y múltiple se realizó al nivel M y nivel A, y la aplicación individual, se utilizó el nivel A únicamente. En el SR y en el SNR se determinaron pH, CE y metales disponibles; en planta se determinó el peso seco por órgano y la concentración de metales en raíces, tallos, hojas y flores. Se efectuaron correlaciones a fin de evaluar la relación entre disponibilidad de metales en ambos suelos y absorción por las plantas. Los resultados mostraron que la exposición a varios de los metales causó una disminución significativa en la biomasa aérea de varios tratamientos, resultando especialmente afectados el peso seco de hojas y flores; excepto en el caso de Cr, las aplicaciones múltiples de metales mostraron un efecto sinérgico respecto al agregado individual de los mismos, reduciendo significativamente el crecimiento de las plantas. El Cr fue el elemento que individualmente ejerció el mayor efecto tóxico sobre el crecimiento. En varios de los tratamientos el pH del SNR fue más ácido que el del SR, lo que sugiere que en esos casos la acidificación de la rizosfera, no operó en la disponibilidad de los metales. Solo para Cd y Ni y Zn en algunos tratamientos, la concentración de metales pesados disponibles en el SR fue significativamente diferente al SNR. Por otro lado, Cr, Cu y Pb, sólo mostraron efecto significativo del tratamiento en la disponibilidad. Las concentraciones de todos los metales en las plantas siguieron el orden raíces>tallos>hojas>flores. Excepto Cr, los metales aplicados en forma individual, mostraron menor acumulación en planta. Zinc ejerció un efecto sinérgico sobre la acumulación de Cd en aplicación múltiple; esto se tradujo en un aumento de la concentración de Cd en las raíces, tallos y hojas de *P. hortorum*. Ni mostró una interacción antagónica con Cd en aplicación ternaria; Plomo mostró un antagonismo con Zn, siendo menor su absorción, principalmente en aplicación múltiple y ternaria. Finalmente, Cu presentó un sinergismo con los otros metales en aplicación múltiple y ternaria. Los resultados del análisis de correlación muestran correlaciones estadísticamente significativas entre la acumulación en raíces, tallos y hojas de *P. hortorum* y el contenido de metales en el SR y SNR. Las excepciones fueron Cd, Cu y Zn en algunos órganos de la planta.

#### **\*Efecto de la longitud del periodo de crecimiento de *P. hortorum* sobre la eficiencia de la fitoextracción**

Los objetivos del capítulo V fueron determinar la acumulación de metales y su tasa de absorción en la biomasa de raíces, tallos, hojas y flores a lo largo de diferentes momentos de cosecha; además evaluar el potencial de diversos índices de acumulación de metales para registrar las variaciones en la producción de biomasa de *P. hortorum* y la concentración de metales. Se desarrolló un experimento cuyos tratamientos fueron: suelo control, y dos niveles de contaminación (nivel M y nivel A) con 6 metales (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn). Para tal fin, se efectuaron cosechas destructivas cada 30 días aproximadamente, y se determinaron peso seco total, radical y de los componentes de la biomasa aérea, y cálculos TIN y TCR. En planta se midieron metales en raíces, tallos, hojas, y flores y se calculó la UR de los mismos. Los resultados mostraron una reducción significativa en la biomasa total en las plantas

para las cosechas 3 y 4 ( $P < 0,05$ ) para los tratamientos con metales. El peso seco de raíces disminuyó significativamente ( $P < 0,05$ ) en el nivel A en relación al control y el nivel M pero no se observó efecto del momento de cosecha sobre este parámetro. Tallos y hojas mostraron una interacción “tratamiento x momento de cosecha” estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ). En las plantas control la biomasa de estos 2 componentes fue mayor, mientras que en los tratamientos con metales el peso seco de tallos se mantuvo estable mientras el peso de hojas tendió a disminuir. El TIN arrojó diferencias significativas entre momentos de cosecha ( $p < 0,05$ ), mostrando en el nivel M valores mayores al 100% para las cosechas 1 y 2, indicando un incremento neto en biomasa en relación al control. Sin embargo, los valores de este índice fueron muy inferiores al 100% en las cosechas 3 y 4, mostrando menor crecimiento tanto en el nivel M como en el nivel A. Por otro lado, los tratamientos con metales presentaron menores TCR comparados con el tratamiento control; sin embargo dicha tasa se incrementó a lo largo del experimento, siendo superior para las cosechas 3 y 4 ( $p < 0,05$ ). La concentración de todos los metales siguió el orden (raíces>tallos>hojas>flores). El ANOVA reveló un efecto significativo de los tratamientos en la concentración de metales en los diferentes órganos de las plantas ( $P < 0,05$ ), aunque no hubo efecto del momento de cosecha, excepto para los casos de Cd, Ni y Pb en raíces; por otro lado, la concentración de Cd y Ni en raíces mostró interacción significativa “tratamiento x momento de cosecha”. En contraste, la concentración de metales en tallos y hojas no arrojó diferencias significativas a lo largo de las cosechas, aunque en el nivel A se observó una disminución en la concentración de metales en las cosechas 3 y 4. En el control la UR de Cu, fue estable tanto para raíces como parte aérea; Zinc, en cambio, mostró tasas variables en ambos órganos. En el nivel M la UR para Zn y Ni en raíces fue positiva al comienzo y al final del periodo de crecimiento, registrándose las menores UR en la cosecha 3 aproximadamente. La UR para la biomasa aérea fue generalmente positiva, aunque Ni y Zn, mostraron un decrecimiento en este parámetro a través las cosechas. Las UR para Cd, Cr, Cu, y Pb, tanto en raíces como parte aérea, fueron prácticamente constantes a lo largo de las cosechas. En raíces en el nivel A la UR para Zn y Ni tuvieron tasas positivas al comienzo pero negativas al final del periodo de crecimiento. Nuevamente, Cd, Cr, Cu y Pb mostraron tasas más estables. La biomasa aérea en el nivel A para el caso de Cd y Ni mostró tasas decrecientes a través del tiempo, llegando a tasas negativas. El resto de los elementos mostraron tasas estables.

#### **\*Cambios morfológicos inducidos por los metales y efectos sobre la calidad ornamental de malvón**

El objetivo del capítulo VI fue cuantificar el efecto de los metales sobre la calidad ornamental de *P. hortorum*. Teniendo como base los experimentos descritos en el capítulo III, en diferentes momentos desde el comienzo de los mismos se realizaron determinaciones no destructivas de área foliar, área de flores, altura y diámetro de plantas. Además se determinó peso seco, relación raíz/parte aérea y TCR de las plantas. De acuerdo con los resultados, en general los tratamientos con metales mostraron una disminución significativa en el área foliar con respecto al control. En el experimento 2, los efectos sobre el área foliar fueron más severos que en el experimento 1. En el experimento 1 el área de flor siguió el orden control > nivel M > nivel A desde el comienzo de las mediciones; el experimento 2 mostró una tendencia similar, pero produjo muy pocas flores a lo largo del ensayo. Las variables diámetro y altura en el experimento 1 mostraron diferencias significativas hacia el final del experimento, sobre todo para la dosis más alta de metales. En el experimento 2, en cambio, se encontraron diferencias significativas en diámetro y altura desde la primera fecha de muestreo. Sin embargo, al finalizar el experimento sólo se registraron diferencias significativas en el diámetro de las plantas con metales respecto al control. El agregado de concentraciones crecientes de metales en el experimento 1, afectó el peso seco aéreo y radical en ambos niveles de metales en el suelo; el experimento 2

mostró una tendencia similar, aunque en el nivel M sufrió menos efectos sobre el sistema radical. La relación raíz/parte aérea se incrementó significativamente ( $P < 0,05$ ) en el experimento 1, lo que significa que la planta sacrificó la acumulación de biomasa en los órganos aéreos a favor de su desvío hacia las raíces. En contraste en el experimento 2 no se encontraron diferencias significativas en esta relación; aunque la tendencia muestra que los tratamientos con metales presentan una relación levemente menor al control, indicando que dichos tratamientos afectaron tanto el crecimiento aéreo como radical de las plantas. En ambos experimentos las TCR de los tratamientos con metales fueron significativamente menores a las encontradas en los tratamientos control. En el experimento 1 el nivel A tuvo una tasa cercana a cero, aunque no se registraron tasas negativas de crecimiento. En el experimento 2, en cambio, la TCR fue negativa en ambos niveles de metales en suelo, mostrando que las plantas de este experimento sufrieron una gran pérdida de hojas durante el transcurso del mismo.

## 7.2 Respuestas a los principales interrogantes de la tesis

Previo a esta tesis existían muchos interrogantes, entre ellos

- 1) ¿Cuál es la fracción química de donde extraen los metales?
- 2) ¿Cuál es la fracción física de donde extraen los metales?
- 3) ¿Cuál es el lugar del suelo, en relación con las raíces, de donde extraen los metales?
- 4) ¿En que órgano se acumulan los metales?
- 5) ¿Cuál es el momento del ciclo en el cual extraen los metales con mayor intensidad?
- ¿Existe alguna tendencia de saturación en la absorción de los metales?
- 6) ¿La aplicación de los metales tiene efectos negativos sobre la calidad ornamental de las plantas?

1) Los resultados obtenidos mediante extracción secuencial mostraron que en el suelo control la fracción residual fue la predominante para todos los metales estudiados, mientras que en los suelos a los que se incorporaron metales se observó un incremento en las fracciones más disponibles. La absorción de casi todos los metales estuvo principalmente relacionada con fracciones I, II, y III, siendo éstas las fracciones que más contribuyeron a la biodisponibilidad de estos metales; El Cr y otros metales también registraron una correlación significativa con la fracción IV. Estos últimos resultados contrastan con los que presenta la literatura y pueden ser objeto de varias interpretaciones (errores de la metodología de secuenciación, procesos de adsorción y/o cristalización incompletos, etc). En oposición a la **hipótesis 3.2**, la absorción de los metales parecería estar relacionada con fracciones soluble e intercambiable, unida a materia orgánica y unida a carbonatos, siendo éstas las fracciones que más contribuyeron a la biodisponibilidad de estos metales y solo en el caso específico del Cr y otros metales también con la fracción residual.

2) Excepto en el caso de Pb, los resultados del fraccionamiento físico del suelo mostraron que los metales se asociaron principalmente a la fracción arcilla, siendo las fracciones finas (arcillas+limos) las que más contribuyeron a la absorción de metales por parte de *P. hortorum*. La **hipótesis 3.3** fue aceptada ya que la absorción de casi todos los metales por parte del cultivo correlacionó con los contenidos totales encontrados en las fracciones finas y medias.

3) En general el pH de la rizosfera no varió significativamente respecto al pH del volumen del suelo. Solo en los casos puntuales de Cd, Ni y Zn en los tratamientos T2 (6 metales, nivel A) y T4 (Cu, Pb, Zn, nivel A) la concentración de metales pesados disponibles en el SR fue significativamente diferente al SNR. Por lo tanto nuestros

resultados sugieren la rizosfera no desempeñó un papel preponderante en la regulación de la disponibilidad de los metales pesados en esta especie. La **hipótesis 4.1** fue rechazada ya que para algunos elementos la absorción estuvo vinculada a factores como nivel de metales aplicados e interacciones con la matriz del suelo o con otros elementos.

4) Los resultados de todos los experimentos realizados muestran en general la misma tendencia: *P. hortorum* acumuló una alta proporción de los metales en raíces, siendo menor la acumulación en tallos, hojas y flores (raíces>tallos> hojas > flores). La **hipótesis 3.1** fue aceptada ya que en base a los resultados obtenidos, la mayor acumulación se produjo en las raíces de las plantas seguidas por tallos, hojas y flores.

5) En general, la longitud del periodo de crecimiento no tuvo efectos significativos sobre la concentración de metales en los órganos de *P. hortorum*, excepto en los casos de Cd y Ni en raíces. Nuestros resultados sugieren que la capacidad de remoción de las plantas se mantuvo más o menos estable a lo largo de las cosechas. Por lo tanto, de ser utilizada esta especie en fitorremediación, las plantas deberían ser cosechadas cada un mes a fin de asegurar la máxima exportación de metales a cosecha. La **hipótesis 5.1** fue rechazada, ya que la mayor velocidad de extracción de los ET se presentó en las etapas iniciales de crecimiento, momento en que la biomasa de las plantas fue mayor, y la mayor acumulación se presentó en raíces.

6) Nuestros datos indican que aún en el niveles medios de metales en los suelos puede influir no sólo sobre el crecimiento, sino sobre la calidad ornamental de las plantas de *P. hortorum*. El peso aéreo, el peso radical, altura y diámetro de plantas fueron afectados con las concentraciones crecientes de metales en el suelo, resultando especialmente afectada la formación de nuevas hojas y flores, y el tamaño de las mismas. Sin embargo, pese a los efectos negativos observados, las plantas fueron capaces de continuar su crecimiento y completar su ciclo biológico con producción de flores de aceptable calidad visual, aunque de menor tamaño. La **hipótesis 6.1** fue rechazada.

### 7.3 Relevancia de los resultados obtenidos y respuestas al objetivo general

Los resultados del fraccionamiento secuencial mostraron que el enriquecimiento del suelo con las sales de metales provocó un incremento generalizado de los mismos en todas las fracciones, especialmente las más disponibles, respecto a los metales presentes en el suelo control. Por otro lado, la absorción por parte de *P. hortorum* estuvo vinculada a fracciones disponibles (fracción soluble) y no tan rápidamente disponibles (fracciones unidas a materia orgánica y carbonatos) poniendo en evidencia la mayor biodisponibilidad en el corto plazo de los metales que ingresan al suelo por acción antropogénica. La gran acumulación de metales en las fracciones finas y las correlaciones encontradas entre estas fracciones y la absorción por las plantas, muestran la importancia que tiene la composición granulométrica de los suelos como reservorio de metales pesados para las plantas. En este sentido, suelos con texturas más finas tendrían mayor contenido de metales para su posterior absorción por las plantas, que suelos de texturas más gruesas o con mayor porcentaje de arena. En general, la rizosfera no influyó en la solubilidad y disponibilidad de los metales, por lo que en esta especie el mecanismo de solubilización de metales no estaría relacionado con la acidificación de la rizosfera.

En todos los experimentos realizados *P. hortorum* vio comprometida su producción de biomasa, principalmente aérea, lo cual se vio reflejado en TIN menores

a 100% y bajas de TCR en relación a los tratamientos control. Cromo fue el elemento que más afectó el crecimiento de las plantas cuando fue aplicado solo, mostrando ser el más tóxico. Sin embargo, las aplicaciones múltiples de metales en general tuvieron un efecto sinérgico respecto del agregado individual o en forma ternaria de los mismos, ejerciendo mayor efecto depresor sobre el crecimiento de las plantas. Por otro lado, las plantas acumularon la mayor parte de los metales en raíces independientemente de la combinación y concentración de metales aplicadas. Estas últimas mostraron gran capacidad de acumulación especialmente para Cr y Zn en el experimento realizado en el capítulo III. Sólo en el capítulo IV, en los casos particulares de Cd y Ni en combinación múltiple, y de Cr, cuando fue agregado solo, las plantas acumularon en tallos cantidades de éstos metales equivalentes a plantas hiperacumuladoras de metales. Sin embargo la gran pérdida de biomasa aérea registrada en dichos tratamientos pone en duda la capacidad de esta especie como hiperacumuladora de estos metales. Finalmente, en un experimento posterior la longitud del periodo de crecimiento, en general, no mostró efectos significativos sobre la capacidad de remoción de los metales, mostrando que la mayor acumulación se produce dentro del primer mes del trasplante. Esto último elevaría los costos de fitorremediación, ya que se requerirían varios trasplantes y cosechas a lo largo del año a fin de mejorar la eficiencia del proceso. Por todo lo mencionado la especie utilizada, en general, no mostró capacidad para hiperacumular metales, siendo afectados varios de sus procesos productivos, así como también su calidad comercial; por lo tanto su utilidad en remediación sería limitada, al menos con los niveles de metales usados en esta tesis.

#### **7.4 Contribuciones de la tesis al avance del conocimiento y potenciales líneas de investigación a futuro**

Entre las contribuciones se pueden destacar

-El enfoque integral del proyecto, el cual considera la interacción entre los factores suelo y planta sumados además del trabajo en contenedores con suelo, más complejo y cercano a las condiciones reales de campo que la hidroponía, que es la forma usual de desarrollar este tipo de investigaciones.

-El uso de una especie ornamental ya que la capacidad para acumular metales de estas especies ha sido poco estudiada. Si bien la planta no mostró gran capacidad para su uso en fitorremediación la misma podría ser tomada como un "sistema modelo" a fin de mejorar la comprensión general de las interacciones suelo-planta-metales contaminantes.

-La combinación de fraccionamiento químico y sobre todo del fraccionamiento físico del suelo, y la cuantificación de la toma de metales desde cada fracción por parte de las raíces.

-El estudio de la influencia de la rizosfera en la acumulación de estos metales en planta, que viene siendo estudiado desde hace muchos años, aunque con resultados contradictorios ante la presencia de distintas combinaciones de metales en el suelo; además el estudio de los fenómenos de sinergismo y antagonismo entre metales, que generalmente se estudia en pares de elementos, pero en este caso se trabaja con los metales agrupados en combinaciones ternarias y de 6 elementos, tal como suele encontrarse en condiciones reales.

-Finalmente, la evaluación de la calidad ornamental de estas plantas sometidas a metales, constituye un aspecto tecnológico para este tipo de cultivos no siempre considerado.

A modo de síntesis, un aporte significativo al conocimiento de la fitorremediación proveniente del estudio de esta especie es que contribuyó a mejorar la comprensión de varios procesos a nivel suelo y planta, pudiendo tomarse como base para futuros estudios de remediación de suelos.

#### Potenciales líneas de investigación a futuro

La tesis constituye un ejemplo profundo de investigación en escala agronómica de las posibilidades de una especie, en relación a su respuesta a un medio enriquecido con metales pesados. De la tesis surgen varios temas que pueden llegar a ser potenciales líneas de investigación a futuro; entre ellos, dadas las limitaciones encontradas en esta especie, el uso de otras especies ornamentales de valor latente, ya que hasta el momento existe muy poca información acerca de plantas ornamentales utilizadas para este propósito. Estas especies brindan una perspectiva novedosa en la remediación de suelos de áreas urbanas y periurbanas contaminados con metales en forma puntual (industrias, vertederos, cinturones hortícolas, etc.), con el beneficio económico de la recuperación del suelo y la mejora del paisaje. Además muchas de estas especies presentan un valor agregado (por ejemplo producción de aceites para la industria farmacéutica). Otra línea podría referirse a trabajar con *P. hortorum* en sitios de contaminación moderada, con niveles cercanos al nivel medio usado en esta tesis o niveles inferiores a fin de observar su comportamiento bajo estas condiciones. Por otro lado, líneas de investigación tecnológica podrían involucrar las posibilidades de este cultivo ante un aporte importante de nutrientes adicionales, el manejo de los residuos derivados de la fitorremediación y la disposición final de los mismos, tema de intenso debate actual en el ámbito científico y académico. A nivel investigación más básica, la variada respuesta de la planta estudiada ante las distintas situaciones de estrés a que fue sometida, permite plantear el avance a escala bioquímica y analizar la formación de radicales oxidantes y, como contrapartida, la formación de distintos antioxidantes.

## Referencias

- Aboulroos S.A.; M.I.D. Helal & M.M. Kamel. 2006. Remediation of Pb and Cd polluted soils using in situ immobilization and phytoextraction techniques. *Soil Sediment Contam.* 15:199-215.
- Acevedo, H; C. Gómez; G. Pinto; J. Fernández; S. Loureiro & C. Santos. 2005. Cadmium effects on sunflower growth and photosynthesis. *J. Plant. Nutr.* 28:2211-2220.
- Adriano, D.C. 2001. Trace elements in terrestrial environments: Biogeochemistry, bioavailability, and risks of heavy metals. 2<sup>nd</sup> ed. Springer-Verlag, New York. 867pp.
- Agbenin, J.Q. & H. Tiessen. 1995. Phosphorus forms in particle size fractions of a toposequence from Northeast Brazil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59:1687-1693.
- Ahumada, I.; J. Mendoza & L. Ascar. 1999. Secuential extraction of heavy metals in soil irrigated with wastewater. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 30:1507-1519.
- Alloway, B.J. & A.P. Jackson. 1991. The behaviour of heavy metals in sewage sludge-amended soils. *Sci. Total Environ.* 100:151-176.
- Alloway, B.J. 1995. Heavy metals in soils. Second Edition. Blackie and professional, London, Glasgow, U.K. 332pp.
- An, Y.J.; Y.M. Kim; T.I. Kwon & S.W. Jeong. 2004. Combined effects of copper, cadmium, and lead upon *Cucumis sativus* growth and bioaccumulation. *Sci. Total Environ.* 326:85-93.
- Andersson, A. & G. Siman. 1991. Levels of Cd and some other trace elements in soil and crops as influenced by lime and fertilizer level. *Acta Agr. Scand.* 41:3-11.
- Andrade, M.L.; M.L. Reyzabal; P. Marcel & M.J. Montero. 2002. Industrial Impact on Marsh Soils at the Bahia Blanca Ria, Argentina. *J. Environ. Qual.* 31:532-538.
- Andrewes, P.; R.M. Town; M.J. Hedley & P. Loganathan. 1996. Measurement of plant-available cadmium in New Zealand soils. *Aust. J. Soil Res.* 34:441-452.
- Angelova, V.; R. Ivanova; V. Delibaltova & K. Ivanov. 2004. Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp), *Ind. Crops Prod.* 19:197-205.
- Angelova, V.; R. Ivanova; G. Todorov & K. Ivanov. 2007. Heavy Metal Uptake by Rape. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 39:344-357.
- Antosiewicz, D. M. 1995. The relationships between constitutional and inducible Pb-tolerance and tolerance to mineral deficits in *Biscutella laevigata* and *Silene inflata*. *Environ. Exp. Bot.* 35:55-69.
- Antúnez, I.; E.C. Retamosa & R. Villar. 2001. Relative growth rate in phylogenetically related deciduous and evergreen woody species. *Oecologia* 128:172-180.
- Appel, C. & L. Ma. 2002. Concentration, pH, and surface charge effects on cadmium and lead sorption in three tropical soils. *Environ. Qual.* 31:581-589.
- Arduini, I.; D.L. Godbold & A. Onnis. 1994. Cadmium and copper change root growth and morphology of *Pinus pinea* and *Pinus pinaster* seedlings. *Physiol. Plantarum* 92:675-680.
- Arduini, I.; A. Masoni; M. Mariotti & L. Ercoli. 2004. Low cadmium application increase miscanthus growth and cadmium translocation. *Environ. Exp. Bot.* 52:153-164.
- Arshad, M.; E. Pinelli; J. Silvestre; J. Kallerhoff; M. Kaemmerer; A. Tarigo; M. Shahid; M. Guiresse; P. Pradereand & C. Dumat. 2008. A field study of lead phytoextraction by various scented *Pelargonium* cultivars. *Chemosphere* 71:2187-2192.
- Ashmore, M. 1997. Plants and pollution. Pp 568-581 In: Plant ecology. M. J. Crawley (eds). Second edition. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Audet, P. & C. Charest. 2007. Heavy metal phytoremediation from a meta-analysis perspective. *Environ. Pollut.* 147:231-237.

- Badilla-ohlbaum R.; R. Ginocchio; P.H. Rodríguez; A. Céspedes; S. González; H.E. Allen & G.E. Lagos. 2001. Effect of soil copper content on copper load of selected crop plants in central Chile. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:2749-2757.
- Baker, A.J.M. 1981. Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.* 3:643-54.
- Baker, A.J.M., 1987. Metal tolerance. *New Phytol.* 106: 93-111.
- Baker, A.J.M. & R.R. Brooks. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements- a review of their distribution, ecology and phytochemistry *biorecovery* 1:81-126.
- Baker, A.J.M. & P.L. Walker. 1989. Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. *Chem. Special. Bioavailab.* 1:7-17.
- Bakirdere, S. & M. Yaman 2008. Determination of lead, cadmium and copper in roadside soil and plants in Elazig, Turkey. *Environ. Monit. Assess.* 136:401-410.
- Balaguer, J.; M.B. Almendo; I. Gomez; J. Navarro-Pedreno & J. Mataix. 1998. Tomato growth and yield affected by nickel presented in the nutrient solution. *Acta Hort.* 458:269-272.
- Banerjee, G. & S.Sarker. 1997. The role of *Salvinia rotundifolia* in scavenging aquatic Pb(II) pollution: a case study. *Bioprocess Eng.* 17:295-300.
- Bañuelos, G.; N.B. Terry; D.L. Leduc; E.A.H. Pillon-Smits & B. Mackey. 2005. Field trial of transgenic Indian mustard plants shows enhanced phytoremediation of selenium-contaminated sediment. *Environ. Sci. Technol.* 39:1771-1777.
- Barcelo, J.; C. Poschenriender; A. Ruano & B. Gunse. 1985. Leaf water potential in Cr (VI) treated bean plants (*Phaseolus vulgaris* L). *Plant Physiol.* 77:163-4.
- Barcelo J.; M.D. Vazques & C.H. Poschenrieder. 1988. Structural and ultrastructural disorders in cadmium-treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *New Phytol.* 108:37-49.
- Barceló, J. & C. Poschenrieder. 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *J. Plant Nutr.* 13:1-3.
- Basta, N.T.; J.A. Ryan & R.L. Chaney. 2005. Trace element chemistry in residual-treated soil: Key concepts and metal bioavailability. *J. Environ.Qual.* 34:49-63.
- Bernal, M.P. & S.P. McGrath. 1994 Effects of pH and heavy metal concentrations in solution culture on the proton release, growth and elemental composition of *Alyssum murale* and *Raphanus sativus* L. *Plant Soil* 166:83-92.
- Bernal, M.P.; S.P. McGrath; A.J. Miller & A.J.M. Baker. 1994. Comparison of the chemical changes in the rhizosphere of the nickel hyperaccumulator *Alyssum murale* with the non-accumulator *Raphanus sativus*. *Plant Soil* 164:251-259.
- Berti, W.R. & S.D. Cunningham. 1993. Remediating soil Pb with green plants. Presented at the internatl Conf. Soc. Environ. Geochem. Health. July 25-27, New Orleans.
- Bhattacharyya, P.; A. Chakraborty; K. Chakrabarti; S. Tripathy & M.A. Powell. 2005. Chromium uptake by rice and accumulation in soil amended with municipal solid waste compost. *Chemosphere.* 60:1481-1486.
- Bishnoi, N.R.; I.S. Sheoran & R. Singh. 1993. Influence of cadmium and nickel on photosynthesis and water relations in wheat leaves of different insertion level. *Photosynthetica* 28:473-479.
- Bizoux, J. P.; F. Brevers; P. Meerts; E. Graitson & G. Mahy. 2004. Ecology and conservation of Belgian populations of *Viola calaminaria*, a metallophyte with a restricted geographic. *Belg. J. Bot.* 137:91-104.
- Blake, R.C.; D.M. Choate; S. Bardhan; N. Revis; L.L. Barton & T.G. Zocco. 1993. Chemical transformation of toxic metals by a *Pseudomonas* strain from a toxic waste site. *Environ. Toxicol. Chem.* 12:1365-1376.
- Blaylock, M.J., D.E. Salt; S. Dushenkov; O. Zakharova; C. Gussman; Y. Kapulnik; B.D. Ensley & I. Raskin. 1997. Enhanced accumulation of Pb in Indian Mustard by soil-applied chelating agents. *Environ. Sci. Technol.* 31:860-865.

- Blaylock, M.J. & J.W. Huang. 2000. Phytoextraction of metals. Pp. 53-88. In: Raskin, I. and B.D. Ensley (eds). Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean-up the environment. John Wiley & Sons, New York.
- Blum, A. 1997. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. In: Belhassen, E. (Ed.). Pp. 57-70. Drought Tolerance in Higher Plants: Genetical, Physiological and Molecular Biological Analysis, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Bolan, N.S.; D.C. Adriano; P. Mani; A. Duraisamy & S. Arulmozhiselvan. 2003. Immobilization and phytoavailability of cadmium in variable charge soils: Effect of phosphate addition. *Plant Soil* 250:83-94.
- Bravin, M.; A. Martí; M. Clairotte & P. Hinsinger. 2009a. Rhizosphere alkalization-a major driver of copper bioavailability over a broad pH range in an acidic, copper-contaminated soil. *Plant Soil* 318:257-268.
- Bravin, M.; P. Tentscher; J. Rose & P. Hinsinger. 2009b. Rhizosphere pH gradient controls copper availability in a strongly acidic soil. *Environ. Sci. Technol.* 43:5686-5691.
- Brown, P.H.; R.M.; Welch & E.E. Cary. 1988. Nickel: A micronutrient essential for higher plants. *Plant Physiol.* 85: 801-803.
- Brown, S.L.; R.L. Chaney; J.S. Angle & J.A. Ryan. 1998. The phytotoxicity of cadmium to lettuce in long-term biosolids-amended soils. *J. Environ. Qual.* 27:1071-1078.
- Brown, S.L.; R.L. Chaney; J.S. Angle & A.J.M. Baker. 1994. Phytoremediation potential of *Thlaspi caerulescens* and bladder campion for zinc and cadmium-contaminated soil. *J. Environ. Qual.* 23:1151-1157.
- Brown, S.L.; R.L. Chaney; J.S. Angle & A.M. Baker. 1995. Zn and Cd uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* grown in nutrient solution. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59:125-133.
- Brun, L.A.; J. Le Corf & J. Maillet. 2003. Effects of elevated soil copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species. *Environ. Pollut.* 122: 361-368.
- Brune, A.; W. Urbach & K.J. Dietz. 1994. Compartmentation and transport of zinc in barley primary leaves as basic mechanisms involved in zinc tolerance. *Plant Cell Environ.* 17:153-162.
- Cai, S.; Y. Lin; H. Zhineng; Z. Xiansu; Y. Zhalou; L. Yuanrong; J. Rongdi; Z. Wenhau & Z. Fangyuan. 1990. Cadmium exposure and health effects among residents in an irrigation area with ore dressing wastewater. *Sci. Total Environ.* 90:67-73.
- Cakmak, I. & H. Marschner. 1987. Mechanism of phosphorus-induced zinc deficiency in cotton. III. Changes in physiological availability of Zn in plants. *Physiol. Plant.* 70:13-20.
- Camillon, M.; M. Hurtado; A. Roca; M. Da Silva; L. Mormeneo & B. Guichon. 1995. Niveles geogénicos en metales pesados en suelos del Partido de La Plata y sus alrededores. *Proceedings IV Jornadas Geológicas y Geofísicas Bonaerenses* 2:57-65.
- Cancès, B.; M. Ponthieu; M. Castrec-Rouelle; E. Aubry & M.F. Benedetti. 2003. Metal ions speciation in a soil and its solution: experimental data and model results. *Geoderma* 113:341-355.
- Canet, R.; F. Pomares & F. Tarazona. 1997. Chemical extractability and availability of heavy metals after seven year application of organic wastes to a citrus soil. *Soil Use Manage.* 13:117-121.
- Caselles, J.; C. Colliga & P. Zornoza. 2004. Evaluation of trace element pollution from vehicle emissions in petunia plants. *Water Air Soil Pollut.* 136:1-9.
- Cavallaro, N. & M.B. McBride. 1984. Zn and Cu sorption and fixation by an acid soil clay: effect of selective dissolutions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 48:1045-1054.
- Cervantes, C.; J.C. Garcia; S. Devars; F.G. Corona & H.L. Tavera. 2001. Interactions of chromium with micro-organisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:335-47.

- Chairidchai, P. & G.S.P. Ritchie. 1992. The effect of pH on zinc adsorption by lateritic soil in the presence of citrate and oxalate. *J. Soil Sci.* 43: 72-728.
- Chaney, R.L. & P.M. Giordano. 1977. Microelements as related to plant deficiencies and toxicities. Pp 235-279. In: L.F. Elliott and F.J. Stevenson (eds) *Soils for management of organic wastes and wastewaters*. Am. Soc. Agron., Madison, WI.
- Chaney, R.L. 1993. Zinc phytotoxicity. Pp. 135-150. In: *Zinc in soils and plants*. A.D. Robson (eds.) Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Chaney, R.L.; M. Malik; Y.M. Li; S.L. Brown; E.P. Brewer; J.S. Angle & A.J.M. Baker. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:279-284.
- Chaney, R.L.; Y.M. Li; J.S. Angle; A.J.M. Baker; S.L. Reeves; F.A. Brown; F.A. Homer; M. Malik & M. Chin. 1999. Improving metal hyperaccumulators wild plants to develop commercial phytoextraction systems: Approaches and progress. Pp 129-158. In: Terry, N. and G.S. Bañuelos (eds) *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. C.R.S press., Boca Raton, Fl.,
- Chatterjee, J. & C. Chatterjee. 2000. Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environ. Pollut.* 109:69-74.
- Chaudhuri, D.; S. Tripathy; H. Veeresh; M.A. Powell & B.R. Hart. 2003. Mobility and bioavailability of selected heavy metals in coal ash- and sewage sludge-amended acid soil. *Environ. Geol.* 44:419-432.
- Chlopecka, A.; J.R. Bacon; M.J. Wilson & J. Kay. 1996. Forms of cadmium, lead and zinc in contaminated soils from southwest Poland. *J. Environ. Qual.* 25: 69-79.
- Chojnacka, K.; A. Chojnacki; H. Górecka & H. Górecki. 2005. Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants. *Sci. Total Environ.* 337:175-182.
- Christensen, B.T. 1992. Physical fractionation of soil and organic matter in primary particle size and density separates. *Adv Soil Sci* 20:1-90.
- Clarkson, D.T. & U. Lutge. 1989. Mineral nutrition: Divalent cations. Transport and compartmentation. *Prog. Bot.* 51:93-112.
- Clemens, S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212: 475-486.
- Clemens, S.; G. Palmgren & U. Krämer. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci.* 7:309-315.
- Clijsters, H.; A. Cuypers & J. Vangronsveld. 1999. Physiological response to heavy metals in higher plants; defence against oxidative stress. *Z. Naturforsch.* 54:730-734.
- Cluis, C. 2004. Junk-greedy greens: phytoremediation as a new option for soil decontamination. *BioTech Journal* 2:60-67.
- Cobbett, C. & P. Goldsbrough. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:159-182.
- Cogger, C.G.; A.I. Bary; S.C. Fransen & D.M. Sullivan. 2001. Seven years of biosolids versus inorganic nitrogen applications to tall fescue. *Journal of Environ. Qual.* 30:2188-2194.
- COMUNIDAD ECONÓMICA EUROPEA. 1986. Directiva 86/278/CEE del Consejo de 12 de junio de 1986 relativa a la protección del medio ambiente y, en particular, de los suelos, en la utilización de los lodos de depuradora en agricultura. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* de 4 de Julio de 1986.
- Conesa, H.M. & F.J. Jiménez-Cárceles. 2007. The Mar Menor lagoon (SE Spain): a singular natural ecosystem threatened by human activities. *Mar. Pollut. Bull.* 54: 839-849.
- Cox, R.M. 1988a. Sensivity of forest plant reproduction to long-range transported air pollutants: the effects of wet deposited acidity and cooper on reproduction of *Populus tremuloides*. *New Phytol.* 110:33-38.
- Cox, R.M. 1988b. The sensivity of pollen from various coniferous and broad-leaved trees to combinations of acidity and trace metals. *New Phytol.* 109:193-201.

- Crowley, D.E.; Y.C. Wang; C.P.P. Reid & P.J. Szansizla. 1991. Mechanism of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant Soil* 130:179-198.
- Cui, Y.S.; Q.R. Wang; Y.T. Dong; H.F. Li & P. Christie. 2004. Enhanced uptake of soil Pb and Zn by Indian mustard and winter wheat following combined soil application of elemental sulphur and EDTA. *Plant Soil* 261:181-188.
- Cunningham, S.D. & D.W. Ow. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.* 110:715-719.
- Curie, C.; J.M. Alonso; M. Le Jean; J.R. Ecker & J.F. Briat. 2000. Involvement of Nramp1 from *Arabidopsis Thaliana* in iron transport. *Biochem. J.* 347:749-755.
- Dan, T.V.; S. KrishnaRaj & P.K. Saxena. 2002. Cadmium and Nickel uptake and accumulation in scented geranium (*Pelargonium sp.*" Frensham"). *Water Air Soil Pollut.* 137:355-364.
- Davidson, H. R. & C.A. Campbell. 1984. Growth rates, harvest index and moisture use of Manitou spring wheat as influenced by nitrogen, temperature and moisture. *Can. J. Plant Sci.* 64:825-39.
- Davies, B.E. 1992. Inter-relationship between soil properties and uptake of Cd, Cu, Pb and Zn from contaminated soils by radish (*Raphanus sativa L.*). *Water Air Soil Pollut.* 63:331-342.
- Davies Jr., F.T.; J.D. Puryear; R.J. Newton; J.N. Egilla & J.A. Saraivagrossi. 2001. Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). *J. Plant Physiol.* 158:777-786.
- Davison, H.R. & C.A. Campbell. 1984. Growth rates, harvest index and moisture use of Manitou spring wheat as influenced by nitrogen, temperature and moisture. *Can. J. Plant Sci.* 64:825-39.
- Dinelli, E. & A. Lombini. 1996. Metal distribution in plants growing on copper mine spoils in Northern Apennines, Italy: the evaluation of seasonal variation. *Appl. Geochem.* 11:375-85.
- Dube, B.K.; K. Tewari; J. Chatterjee & C. Chatterjee. 2003. Excess chromium alters uptake and translocation of certain nutrients in citrullus, *Chemosphere* 53:1147-1153.
- Ducadior, J. & I. Lamy. 1995. Evidence of trace metal association with soil organic matter using particles size fractionation after physical dispersion treatment. *Analyst.* 120:741-745.
- Dudka, S.; R. Ponce-Hernandez; G. Tate & T.C. Hutchinson. 1996. Forms of Cu, Ni and Zinc in soils of Sudbury, Ontario and metal concentrations in plants. *Water Air Soil Pollut.* 90:531-542.
- Duruibe, J.O.; M.O.C. Ogwuegbu & J.N. Egwurugwu. 2007. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *Int. J. Phys. Sci.* 2:112-118.
- Ebbs, S.D. & L.V. Kochian. 1997. Toxicity of zinc and copper to *Brassica* species: implications for phytoremediation. *J. Environ. Qual.* 26:776-781.
- Ebbs, D.S.; M.M. Lasat; D.J. Brady; J. Cornish; R. Gordon & L.V. Kochian. 1997. Phytoextraction of Cd and Zn from a contaminated site. *Journal of Environ. Qual.* 26:1424-1430.
- Eriksson, J.E. 1990. A field study on factors influencing Cd levels in soils and grain of oat and winter wheat. *Water Air Soil Pollut.* 53:69-81.
- Ernst, W.H.O.; J.A.C. Verkleij & H. Schat. 1992. Metal tolerance in plants. *Acta Bot. Neerl.* 41:229-248.
- Ernst, W.H.O. 1996. Bioavailability of heavy metals and decontamination of soil by plants. *Appl. Geochem.* 11:163-167.
- Ernst, W.H.O. & H.J.M. Nelissen. 2000. Life-cycle phases of a zinc-and cadmium-resistant ecotype of *Silene vulgaris* in risk assessment of polymetallic mine soils. *Environ. Pollut.* 107:329-338.
- FAO/WHO. 1995. Application of risk analysis to food standards issues. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation. Geneva, 13 - 17 March. WHO, Geneva.

- Fergusson, J.E. 1990. The heavy elements: Chemistry, environmental impact, and health effects. Pergamon Press, Oxford, England, 614pp.
- Forstner, U.; W. Calmano & J. Shoer. 1982. Heavy metals in bottom sediments and suspended material from the Elbe, Weser and Ems estuaries and from the German Bight (southeastern North Sea). *Thalassia Jugosl.* 18:97-122.
- Freitas, H.; V. Nabais & J. Paiva. 1991. Heavy metals pollution in the urban areas and roads of Portugal using *Nerium oleander L.* In: Farmer, J.G. (ed). Proceedings of the International Conference Heavy metals in the Environment.1:240-242. CEP consultants Ltd. Edinburgh.
- Friberg, L.; G.F. Nordberg & V.Vouk. 1986. Handbook on the toxicology of metals. 2<sup>nd</sup> ed. Elsevier, Amsterdam.
- Gardea-Torresdey, J.L.; J.R. Peralta-Videa; M. Montes; G. de la Rosa & B. Corral-Diaz. 2004. Bioaccumulation of cadmium, chromium and copper by *Convolvulus arvensis L.*: impact on plant growth and uptake of nutritional elements. *Bioresour. Technol.* 92:229-235.
- Gasic, K. & S.S. Korban. 2007. Expression of Arabidopsis phytochelatin synthase in Indian mustard (*Brassica juncea*) plants enhances tolerance for Cd and Zn. *Planta.* 225:1277-1285.
- Gee, G. W. & J.W. Bauder. 1986. Particle-size Analysis. In: A. Klute (Editor), Methods of Soil Analysis. Part1. 2nd ed. Monogr. 9, ASA Madison, WI.
- Gérard, E.; G. Echevarria; T. Sterckeman & J.L. Morel 2000 Cadmium availability to three plant species varying in Cd accumulation pattern. *J. Environ. Qual.* 29: 1117-1123.
- Ghnaya, T.; I. Slama; D. Messedi; C. Grignon; M.H. Ghorbel & C. Abdelly. 2007. Cd-induced growth reduction in the halophyte *Sesuvium portulacastrum* is significantly improved by NaCl. *J. Plant Res.* 120:309-316.
- Ghosh, M. & S.P. Singh. 2005. A review of phytoremediation of heavy metals and utilisation of its byproducts. *Appl. Ecol. Env. Res.* 1:1-18.
- Ginocchio R.; P.H. Rodríguez; R. Badilla-Ohlbaum; H.E. Allen & G. Lagos. 2002. Effect of soil copper content and pH on copper uptake of selected vegetables grown under controlled conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* 21:117-125.
- Giusti, L. 2001. Heavy metal contamination of brown seaweed and sediments from the UK coastline between the Wear River and the Tees River. *Environ. Int.* 26:275-286.
- Gleba, D.J.; N.V. Borisjuk; R. Kneer; A. Poulev; M. Skarzhiskaya; S. Dushenov; S. Longendra; Y.Y. Gleba & I. Raskin. 1999. Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 5973-5977.
- Gothberg, A.; M. Greger; K. Holm & B.E. Bengtson. 2004. Influence level on uptake and effects of mercury, cadmium and lead in water spinach. *J. Environ. Quality* 33:1247-1255.
- Grant, C.A.; L.D. Bailey; M.J. McLaughlin & B.R. Singh. 1999. Managements factors which influence cadmium concentrations in crops. Pp 151-198. In: McLaughlin M.J. and B.R. Singh (eds.) Cadmium in soils and plants. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Netherlands.
- Greger, M. 2004. Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. Pp.1-27 In: M.N.V. Prasad (eds). Heavy Metal Stress in Plants: from Biomolecules to Ecosystems. Second ed.Springier-Verlag, Berlin, Germany.
- Grifferty, A. & S. Barrington. 2000. Zinc uptake by Young Wheat Plants under Two Transpiration Regimes. *J. Environ. Qual.* 29:443-446.
- Guertin, J.; J.A. Jacobs & C.P. Avakian. 2004. Chromium (VI) Handbook. Lewis Publishers/CRC Press, Boca Raton, FL.
- Gussarsson M. 1994. Cadmium-induced alterations in nutrient composition and growth of *Betula pendula* seedlings: the significance of fine root as a primary target for cadmium toxicity. *J. Plant Nutr.* 17:2151-63.

- Haag-Kerwer, A.; H.J. Schafer; S. Heiss; C. Walter & T. Rausch. 1999. Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 50:1827-1835.
- Hadad, H.R.; M.A. Maine; G.S.Natale & C. Bonetto. 2007. The effect of nutrient addition on metal tolerance in *Salvinia herzogii*. *Ecol. Eng.* 31:122-131.
- Hagemeyer J., 1999. Ecophysiology of plant growth under heavy metal stress. In: Prasad M.N.V. Pp. 157-181. Hagemeyer J. (eds.). *Heavy Metals Stress in Plants. From Molecules to Ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Hajiboland, R. 2005. An evaluation of the efficiency of cultural plants to remove heavy metals from growing medium. *Plant Soil Environ.* 51:156-164
- Hall, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53:1-11.
- Hamrick, D. Ball Reedbook. 2003. *Crop Production*. Vol. 2 17<sup>th</sup> Ed. Ball publishing, Batavia. Illinois, 724 pp.
- Han, F.X.; W.I. Kingery; H.M. Selim & P. Gerard. 2000. Accumulation of heavy metals in a long - term poultry waste amended soil. *Soil Sci.* 165:260-268.
- Han, F. X.; A. Banin & G.B. Triplett. 2001. Redistribution of heavy metals in arid-zone soils under a wetting-drying cycle soil moisture regime. *Soil Sci.* 166:18-28.
- Han, F.X.; A. Banin; W.L. Kingery; G.B. Triplett; L.X. Zhou; S.J. Zheng & W.X. Ding. 2003. New Approach to Studies of Heavy Metal Redistribution in Soil. *Adv. in Environ. Res.* 8:113-120.
- Han, F.X.; B.B. Maruthi Sridhar; D.L. Monts & Y. Su. 2004. Phytoavailability and toxicity of trivalent and hexavalent chromium to *Brassica juncea* L. *Czern. New Phytol.* 162:489-499.
- Hansen, D.; P.J. Duda; A. Zayed & N. Ferry. 1998. Selenium removal by constructed wetlands: role of biological volatilization. *Environ. Sci. Technol.* 32:591-597.
- Hanus J. & J.Tomas. 1993. An investigation of chromium content and its uptake from soil in white mustard. *Acta Fytotech.* 48:39-47.
- Haq, A.U.; T.E. Bates & Y.K. Soon. 1980. Comparison of extractants for plant-available zinc, cadmium, nickel, and copper in contaminated soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44:772-777.
- Hart, J.J.; R.M. Welch; W.A. Norvell & L.V. Kochian. 2002. Transport interactions between cadmium and zinc in roots of bread and durum wheat seedlings. *Physiol. Plantarum* 116:73-78.
- Hasinur, R.; S. Shamima; A. Shah & K.W. Shigenao. 2005. Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution. *J. Plant Nutr.* 28: 393-404.
- Hasnain, S. & A.N. Sabri. 1997. Growth stimulation of *Triticum aestivum* seedlings under Cr-stresses by non-rhizospheric pseudomonad strains. *Environ. Pollut.* 97:265-273.
- Haynes, R.J. 1990. Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance. A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant and Soil* 126: 247-264.
- He, Q.B. & B.R. Singh. 1993. Crop uptake of Cadmium from phosphorous fertilizer: I. yield and Cadmium content. *Water Air Soil Pollut.* 74:251-265.
- Herut, B.; M.D. Hornung; N. Kress & Y. Cohen. 1993. Trace metals in shallow sediments from mediterranean Coastal region of Israel. *Mar. Pollut. Bull.* 26:675-682.
- Hinsinger, P. 1998. How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Adv. Agron.* 64:225-265.
- Hinsinger, P.; C. Plassard; C. Tang & B. Jaillard. 2003. Origins of root-induced pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints, a review. *Plant Soil* 248:43-59.
- Hintz, R.W. & K.A. Albrecht. 1994. Dry Matter Partitioning and Forage Nutritive Value of Soybean Plant Components. *Agron. J.* 86:59-62.

- Hjortenkrans D.; B. Bergback & A. Haggerud. 2006. New metal emission patterns in road traffic environments. *Environ. Monit. Assess.* 117:85-98.
- Hodda, P.S.; D. McNulty; B.J. Alloway & M.N. Aitken. 1997. Plant Availability of Heavy Metals in soils previously amended with heavy applications of sewage sludge. *J.Sci Food Agr.* 73:446-454.
- Houba, V.J.G.; T.H.M. Lexmond; I. Novozamsky & J.J. Van der Lee. 1996. State of the art and future developments in soil analysis for bioavailability assessment. *Sci. Total Environ.* 178:21-28.
- Hseu, Z.Y. 2006. Extractability and bioavailability of zinc over time in three tropical soils incubated with biosolids. *Chemosphere* 63:762-771.
- Huang, C.P. 1999. Environmental soil chemistry and human welfare. 14<sup>o</sup> Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo. Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. Temuco. Chile.
- Huang, J.W. & S.D. Cunningham. 1996. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytol.* 134:75-84.
- Huang, J.W.; J. Chen; W.R. Berti & S.D. Cunningham. 1997. Phytoremediation of lead-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.* 31:800-805.
- Huang, K.M. & S. Lin. 2003. Consequences and implication of heavy metal spatial variations in sediments of the Keelung River drainage basin, Taiwan. *Chemosphere* 53:1113-1121.
- Hunt, R. 1978. Plant growth analysis. *Studies in biology* N° 96. Edward Arnold Ltd., London, United Kingdom.
- Illera, V.; I. Walter; P. Souza & V. Cala. 2000. Short-term effects of biosolid and municipal solid waste applications on heavy metals distribution in a degraded soil under a semi-arid environment. *Sci. Total Environ.* 255:29-44.
- Iyengar, S.S.; D.C. Martens & W. P. Miller. 1981. Distributions and plant availability of soil zinc fractions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45:735-9.
- Jackson, A.P. & B.J. Alloway. 1992. Transfer of cadmium from soils to the human food chain. pp 109-158. In: Adriano, D.C. (eds) *Biogeochemistry of Trace Elements*, Lewis Publisher, Baton Rouge, Florida.
- Jones Jr., J.B. & V.W. Case. 1990. Sampling, handling and Analysing Plant Tissue Samples. In: R.L. Westerman (Ed.) *Soil Testing and Plant Analysis*. 3ed. Ed. SSSA Book Series, N° 3. Wisconsin USA, 784 pp.
- Kabala, C. & B.R. Singh. 2001. Fractionation and mobility of copper, lead, and zinc in soil profiles in the vicinity of a copper smelter. *J. Environ. Qual.* 30: 485-492.
- Kabata-Pendias, A. 1993. Behavioral properties of trace metals in soils. *Appl. Geochem.* 2:3-9.
- Kabata-Pendias, A & H. Pendias. 2000. *Trace Elements in Soils and Plants*. (3rd edition) CRC Press. Boca Ratón, Florida 432 pp.
- Kahle, H., 1993. Response of roots of trees to heavy metals. *Environ. Exp. Bot.* 33:99-119.
- Kalavrouziotis I.K.; P.K. Robolas; P.H. Koukoulakis & A.H. Papadopoulos. 2008. Effects of municipal reclaimed water on the macro-, micronutrients of soil and *Brassica oleracea* var. *Italica*, and *Brassica oleracea* var. *Gemmifera*. *J. Agric. Water Management* 95:419-426.
- Karczewska, A.; L. Szerszen & C. Kabala. 1998. Forms of Selected Heavy Metals and Their Transformation In: *Soil Polluted by emissions from copper smelters*. *Adv. GeoEcol.* 31:705-712.
- Kastori, R; M. Petrovic & N. Petrovic. 1992. Effect of excess Pb, Cd, Cu and Zn on water relations in sunflower. *Journal of Plant Nutrition* 15:2427-2439.
- Keller, H. & W. Roemer. 2001. Cu, Zn and Cd acquisition by two spinach cultivars depending on P nutrition and root exudation. *J.Plant Nutr. Soil Sci.* 164:335-342.

- Keller, C.; D. Hammer; A. Kayser; W. Richner; M. Brodbeck & M. Sennhauser. 2003. Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: comparison of different plant species in the field. *Plant Soil* 249:67-81.
- Kim, Y.Y.; Y.Y. Yang & Y. Lee. 2002. Pb and Cd uptake in rice roots. *Physiol. Plant.* 116:368-372.
- Kim, C.G.; J.N.B Bell & S.A. Power. 2003. Effects of soil cadmium on *Pinus sylvestris* L. seedlings. *Plant Soil* 257: 443-449.
- Kirkham, M.B. 1978. Water Relations of Cadmium-treated plants. *J. Environ. Qual.* 7:334-336.
- Klang-Westin, E. & K. Perttu. 2002. Effects of nutrient supply and soil cadmium concentration on cadmium removal by willow. *Biomass Bioenerg.* 6:415-426.
- Kloke, A.; D.R. Sauerbeck & H. Vetter. 1994. Study of the Transfer Coefficient of Cadmium and Lead in Ryegrass and Lettuce. Pp 113. Nriagu, J. (Ed) In: *Changing Metal Cycles and Human Health*, Springer-Verlag, Berlin.
- Knight, B.; F.J. Zhao; S.P. McGrath & Z.G. Shen. 1997. Zinc and cadmium uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* in contaminated soils and its effects on the concentration and chemical speciation of metals in soil solution. *Plant Soil* 197:71-78.
- Korboulewsky, N., S. Dupouyet & G. Bonin. 2002. Environmental risk of applying sewage sludge compost to vineyards: carbon, heavy metals, nitrogen, and phosphorus accumulation. *J. Environ. Qual.* 31:1522-1527.
- Korcak, R.F. & D.S. Fanning. 1985. Availability of applied heavy metals as a function of type of soil material and metal source. *Soil Sci.* 140:23-34.
- Krämer, U.; J.D. Cotter-Howells; J.M. Charnock; A.J.M. Baker J.A.C. Smith. 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379:635-638.
- Krämer, U.; R.D. Smith; W.W. Wenzel; I. Raskin & D.E. Salt. 1997. The role of metal transport and tolerance in Ni hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* Hálácsy. *Plant Physiol.* 115: 1641-1650.
- Krämer, U.; I.J. Pickering, R.C. Prince; I. Raskin & D.E. Salt. 2000. Subcellular Localization and Speciation of Nickel in Hyperaccumulator and Non-Accumulator *Thlaspi* Species *Plant Physiol.* 122:1343-1353.
- Krishnamurti G.S.R.; P.M. Huang & K.C.J. Van Rees. 1997. Kinetics of cadmium release from soils as influenced by organic: implications in cadmium availability. *J. Environ. Qual.* 26:271-277.
- Krishnamurti, G.S.R.; P.M. Huang & L.M. Kozak. 1999. Sorption and desorption kinetics of cadmium from soils: influence of Phosphate. *Soil Sci.* 164: 888-898.
- KrishnaRaj, S.; T.V. Dan & P.K. Saxena. 2000. A fragrant solution to soil remediation. *Int. J. Phytorem* 2:117-132.
- Kukkola, E.; P. Rautio & S. Huttunen. 2000. Stress indications in copper- and nickel-exposed Scots pine seedlings. *Environ Exp. Bot.* 43:197-210.
- Kumar, P.B.A.; V. Dushchenkov; H. Motto & I. Raskin. 1995. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soil. *Environ. Sci. Technol.* 29:1232-1238.
- Kuo, S.; P.E Heilman & A.S. Baker. 1983. Distributions and forms of Cu, Zn, Cd, Fe and Mn in Soils near a copper smelter. *Soil Sci.* 135:101-109.
- Lacerda, L.D.; C.E.V. Carvalho; K.F. Tanizaki; A.R.C. Ovalle & C.E Rezende. 1993. The biogeochemistry and trace metals distribution of mangrove rhizosphere. *Biotropica* 25:252-257.
- Lambers, H. 1998. *Plant Physiological Ecology*, Springer-Verlag. 533 pp.
- Lan, C.Y.; W.S. Shu & M.H. Wong. 1998. Reclamation of Pb/Zn mine tailings at Shaoguan, Guangdong Province, People's Republic of China: the role of river sediment and domestic refuse. *Bioresour. Technol.* 65:117-124.
- Larbi, A.; F. Morales; A. Abadia; Y. Gogorcena; J. Lucena & J. Abadia. 2002. Effects of Cd and Pb in sugar beet plants grown in nutrient solution: induced Fe deficiency and growth inhibition. *Funct. Plant Biol.* 29:1453-1464.

- Larsen P.B.; J. Degenhardt; C.Y. Tai; L.M. Stenzler; S.H. Howell & L.V. Kochian. 1998. Aluminium-resistant *Arabidopsis* mutants that exhibit altered patterns of aluminium accumulation and organic acid release from roots. *Plant Physiol.* 117:9-18.
- Lasat, M.M.; A.J.M. Baker & L.V. Kochian. 1998. Altered Zn compartmentation in the root symplasm and simulated Zn absorption into the leaf as mechanism involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.* 118:875-883.
- Lasat, M.M.; N.S. Pence; D.F. Garvin; S.D. Ebbs & L.V. Kochian. 2000. Molecular Physiology of zinc transport in the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J. Exp. Bot.* 51:71-79.
- Lasat, M.M. 2002. Phytoextraction of toxic metals: a Review of Biological Mechanisms. *J. Environ. Qual.* 31:109-120.
- Lavado, R.S.; M.B. Rodriguez; J.D. Scheiner; M.A. Taboada; G. Rubio; R. Alvarez; M. Alconada & M.S. Zubillaga. 1998. Heavy metals in soils of Argentina: Comparison between urban and agricultural soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 29:1913-1917.
- Lavado, R.S.; C.A. Porcelli & R. Alvarez. 1999 Concentration and distribution of extractable elements in a soil as affected by tillage and fertilization. *Sci. Total Environ.* 232:185-191.
- Lavado, R.S. & C.A Porcelli. 2000. Contents and main fractions of trace elements in Typic Argiudolls of the Argentinean Pampas. *Chem. Spec. Bioavailab.* 12:67-70.
- Lavado, R.S.; M.S. Zubillaga; R. Alvarez & M.A. Taboada. 2004. Baseline levels of potentially toxic elements in pampas soils. *Soil Sediment Contam.* 13:329-339.
- Lavado, R.S.; M.B. Rodríguez & M.A. Taboada. 2005. Treatment with biosolids affects soil availability and plant uptake of potentially toxic elements. *Agr. Ecosyst. Environ.* 109:360-364.
- Lavado, R.S. 2006a. La Región Pampeana: historia, características y uso de sus suelos. Pp 1-11 En: Alvarez, R. (Ed.). *Materia orgánica. Valor agronómico y dinámica en suelos pampeanos*. EFA, Buenos Aires, Argentina.
- Lavado, R.S. 2006b. Concentration of Potentially Toxic Elements in field crops grown near or far from cities of the Pampas (Argentina) *J. Environ. Manage.* 80:116-119.
- LeClaire, J.P.; A. C., Chang; C.S. Levesque & G. Sposito. 1984. Trace metal chemistry in arid-zone field soils amended with sewage sludge: IV. Correlations between zinc uptake and extracted soil zinc fractions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 48:509-513.
- Lee, J.; R.D. Reeves; R.R. Brooks & T. Jaffré. 1977. Isolation and identification of a citrate-complex of nickel from nickel-accumulating plants. *Phytochemistry* 16:1502-1505.
- Li, Z. & L.M. Shuman. 1996. Redistribution of forms of zinc, cadmium, and nickel in soils treated with EDTA. *J. Sci. Total Environ.* 191:95-107.
- Li, L.; F. Li; D. Xiong & C. Song. 2006. Heavy metal contamination and their distribution in different size fractions of the surficial sediment of Haihe River, China. *Environ. Geol.* 50:431-438.
- Li, Y.M.; R. Chaney; E. Brewer; R. Roseberg; J.S. Angle; A.J.M. Baker; R. Reeves & J. Nelkin. 2003. Development of a technology for commercial phytoextraction of nickel: economic and technical considerations. *Plant Soil* 249:107-115.
- Lim, T.T.; J.H., Tay & C.I. The. 2002. Contaminant time effect on lead and cadmium fraction in a tropical coastal clay. *J. Environ. Qual.* 31:806-812.
- Liu, J.N.; Q.X. Zhou; T. Sun; L.Q. Ma & S. Wang. 2008. Identification and Chemical Enhancement of Two Ornamental Plants for Phytoremediation. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 80:260-265.
- Llosa, R.; G. Noriega; E. Negro de Aguirre & E. Kesten. 1990. Niveles de plomo, cadmio, zinc y cobre en suelos del área metropolitana y suburbana de Buenos Aires. *Ciencia del Suelo* 8:3-8.

- Lorenz, S.E.; R.E. Hamon; P.E. Holm; H.C. Domingues; E.M. Sequeira; T.H. Christensen & S.P. McGrath. 1997. Cadmium and zinc in plants and soil solutions from contaminated soils. *Plant Soil* 189:21-31.
- Lösch, R. & K.I. Köhl. 1999. Plant respiration under the influence of heavy metals. Pp 139-156. In: Prasad M.N.V., Hagemeyer, J. (eds.) *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystem*. Springer-Verlag, Berlin.
- Lu, A.; S. Zhang & X.Q. Shan. 2005. Time effect on the fractionation of heavy metals in soils. *Geoderma* 125: 225-234.
- Lunackova, L.; A. Sotnikova; E. Masarovicova; A. Lux & V. Stresko. 2003. Comparison of cadmium effect on willow and poplar in response to different cultivation conditions. *Biol. Plantarum* 47:403-411.
- Luo, Y.M & P. Christie. 1998. Bioavailability of copper and zinc in soils treated with alkaline stabilized sewage sludges. *J. Environ. Qual.* 27:335-342.
- Lutts, S.; I. Lefèvre; C. Delpérée; S. Kivits; C. Dechamps; A. Robledo & E. Correal. 2004. Heavy Metal Accumulation by the Halophyte Species Mediterranean Saltbush. *J. Environ. Qual.* 33:1271-1279.
- Lytle, C.M.; F.W. Lytle; N. Yang; J.H. Oian; D. Hansen; A. Zayed & N. Terry. 1998. Reduction of Cr (VI) to Cr (III) by wetland plants: Potential for in situ heavy metal detoxification. *Environ. Sci. Technol.* 32:3087-3093.
- Ma, L.Q. & G.N. Rao. 1997. Chemical fractionation of Cd, Cu, Ni, and Zn in contaminated soils. *J. Environ. Qual.* 26:259-264.
- Ma, J.F.; P.R. Ryan & E. Delhaize. 2001. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Review. Trends Plant Sci.* 6:273-278.
- MacFarlane, G.R. & M.D. Burchett. 2002. Toxicity, growth and accumulation relationships of copper, lead and zinc in the Grey Mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Veirh. *Mar. Environ. Res.* 54: 65-84.
- MacFarlane, G.R.; A. Pulkownik & M.D.Burchett. 2003. Accumulation and distribution of heavy metals in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh.: biological indication potential. *Environ. Pollut.* 123:139-151.
- Maiz, I.; M.V. Esnaola & E. Millán. 1997. Evaluation of heavy metal availability in contaminated soils by a short sequential extraction procedure. *Science Total Environ.* 206:107-115.
- Maksymiec, W. & T. Baszynski. 1996. Different susceptibility of runner bean plants to excess copper as a function of the growth stages of primary leaves. *J. Plant Physiol.* 149:217-221.
- Mann, S.S. & G.S.P. Ritchie. 1994. Changes in the forms of cadmium with time in some western Australian soils. *Aust. J. Soil Res.* 32:241-250.
- Marmiroli, M.; G. Antonioli; E. Maestri & N. Marmiroli. 2005. Evidence of the involvement of plant ligno-cellulosic structure in the sequestration of Pb: an X-ray spectroscopy-based analysis. *Environ. Pollut.* 134:217-227.
- Marschner, H. & V. Römheld. 1983. *In vivo* measurement of root induced pH changes at the soil-root interface: effect of plant species and nitrogen source. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 111:241-251.
- Marschner, H. 1986. *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, London, U.K. 674 pp.
- Martinez, C.E. & H.L. Motto. 2000 Solubility of Pb, Zn and Cu added to mineral soils. *Environ. Pollut.* 107:153-158.
- Mazen, A.M.A. 2004. Accumulation of four metals in tissues of *Corchorus olitorius* and possible mechanisms of their tolerance. *Biol. Plantarum* 48:267-272.
- Mazhoudi, S.; A. Chaouhi; M.H. Ghorbal & E. Elferjani. 1997. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). *Plant Sci.* 127:129-137.
- Mbila, M.O.; M.L.Thompson; J.S.C Mbagwu & D.A. Laird. 2001. Distribution and movement of sludge-derived trace metals in selected Nigerian soils. *J. Environ. Qual.* 30:1667-1674.

- McBride, M.B. 1994. Environmental Chemistry of soils. Oxford University Press, New York, NY.
- McBride, M.; S. Sauve & W. Hendershot. 1997. Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. *Eur. J. Soil Sci.* 48:337-346.
- McGrath, S.P. 1982. The uptake and translocation of tin and hexavalent chromium and effects on the growth of oat in lowering nutrient solution and in soil. *New Phytol.* 92: 381-390.
- McGrath, S.P. & C.H. Cunliffe. 1985. A simplified method for the extraction of the metals Fe, Zn, Ni, Pb, Cr, Co, and Mn from soils and sewage sludges. *J. Sci. Food Agric.* 36:794-798.
- McGrath, S.P. & J. Cegarra G.N. 1992. Chemical extractability of heavy metals during and after long-term applications of sewage sludge to soil. *J. Soil Sci.* 43:313-321.
- McGrath, S.P.; Z.G. Shen & F.J. Zhao. 1997. Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soils. *Plant Soil.* 188:153-159.
- McGrath, S.P. 1998. Phytoextraction for soil remediation. Pp 261-268. In: Brooks, R.R. (eds.) Plants that hyperaccumulate heavy metals: their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytomining. New York, CAB International.
- McGrath, S.P.; S.J. Dunham & R.L. Correll. 2000. Potential for phytoextraction of zinc and cadmium from soils using hyperaccumulator plants. Pp. 109-128. Terry, N. and G. Bañuelos, (eds). In: Phytoremediation of Contaminated Soil and Water. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- McGrath, S. P. & F.J. Zhao. 2003. Phytoextraction of metals and metalloids. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14:277-282.
- McGrath, S.P.; E. Lombi; C.W. Gray; N. Caille, S.J. Dunham & F.J. Zhao. 2006. Field evaluation of Cd and Zn phytoextraction potential by the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri*. *Environ. Pollut.* 141:115-125.
- McLaughlin, M.J. & B.R. Singh. 1999. Cadmium in soils and plants: a global perspective. Pp.1-19. In: McLaughlin, M.J.; Singh, B.R. (Ed.). Cadmium in soils and plants. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands.
- McLaughlin, M.J.; D.R. Parker & J.M. Clarke. 1999. Metals and nutrients-Food safety issues. *Field Crops Res.* 60:143-163.
- McLaughlin, M.J.; R.E. Hamon; R.G. MacLaren; T.W. Speir & S.L. Rogers. 2000. Review: A bioavailability-based rationale for controlling metal and metalloid contamination of agricultural land in Australia and New Zealand. *Aust. J. Soil Res.* 38:1037-1086.
- McLaughlin, M.J. 2001. Ageing of metals in soils changes bioavailability. *Environ. Risk Assess.* 4:1-6.
- McNair, M.R.; G.R. Tilstone & S.S. Smith. 2000. The genetics of metal tolerance and accumulation in higher plants. Pp. 235-250. In: Terry, N. and G. Bañuelos, (eds.) Phytoremediation of Contaminated Soil and Water. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Merckx, R.; J.H. Van Ginkel; J. Sinnaeve & A. Cremers. 1986a. Plant-induced changes in the rhizosphere of maize and wheat. II. Complexation of cobalt, zinc and manganese in the rhizosphere of maize and wheat. *Plant Soil* 96:95-107.
- Merckx, R.; J.H. van Ginkel; J. Sinnaeve & A. Cremers. 1986b. Plant-induced changes in the rhizosphere of maize and wheat. I. Production and turnover of root-derived material in the rhizosphere of maize and wheat. *Plant Soil* 96:85-93.
- Mertens, J.; P. Vervaeke; E. Meers & F.M.G. Tack. 2006. Seasonal changes of metals in willow (*Salix sp.*) stands for phytoremediation on dredged sediment. *Environ. Sci. Technol.* 40:1962-1968.
- Mills H.A. & J. Benton Jones. 1996. Plant analysis handbook II. Micro-Macro Publishing, Athens, Georgia, 422pp.

- Mills, C.F. 1987. The detection of trace element problems in developing countries. Pp 74-89 In: Said, M., M.A. Rahman, and L.A. D'Silva (eds). Elements in Health and Disease. Hamdard University Press, Karachi, Pakistan.
- Mogollon, J.L.; C. Bifano & B.E. Davies. 1995. Distribution of metals in mechanical fractions of soils from a lake catchment in Venezuela. Environ. Geochem. Health 17:103-111.
- Morikawa, H. & O.C. Erkin. 2003. Basic processes in phytoremediation and some application to air pollution control. Chemosphere. 52:1553-1558.
- Naidu, R.; N.S. Bolan & D.C. Adriano (Eds.). 2003. Bioavailability, toxicity and risk relationships in ecosystems: the path ahead. Pp. 331-339. In: Bioavailability and its Potential Role in Risk Assessment. Science Publishers, New York.
- Nakazawa, R.; T. Ozawa; T. Naito; Y. Kameda & H. Takenaga. 2001. Interactions between Cadmium and Nickel in Phytochelatin Biosynthesis and the Detoxification of the Two Metals in Suspension-Cultured Tobacco Cells. Biol. Plantarum 44:627-630.
- Nanda-Kumar, P.B.A.; V. Dushenkov; H. Motto & I. Raskin. 1995. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. Environ. Science Technol. 29:1232-1238
- Navas A & H. Lindhorfer. 2003. Geochemical speciation of heavy metals in semiarid soils of the central Ebro Valley (Spain). Environ. Int. 29:61-68.
- Nedhi, A.; L.J. Singh & S.I. Singh. 1990. Effect of cadmium and nickel on germination, early seedling growth and photosynthesis of wheat and pigeon pea. Ind. J. Trop. Agric. 8:141-147.
- Nicholson, F.A.; Smith, S.R.; Alloway, B.J.; Carlton-Smith, C. & B.J. Chambers. 2003. An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. Sci. Total Environ. 311:205-219.
- Nogawa, K.; R. Honda; T. Kido; I. Tsuritani & Y. Yamada. 1987. Limits to protect people eating cadmium in rice based on epidemiological studies. Trace Substances in Environmental Health 21:431-439.
- Norvell, W.A. 1984. Comparison of chelating agents as extractants for metals in diverse soil materials. Soil Sci. Soc. Am. J. 48:1285-1292.
- Novozamsky, I.; T.M. Lexmond & V.J.G. Houba. 1993. A single extraction procedure of soil for evaluation of uptake of some heavy metals by plants. Int. J. Environ. Anal. Chem. 51:47-58.
- Nriagu, J.O. 1988. Production and uses of chromium. Pp. 81-105. In: Chromium in natural and human environments. J.O. Nriagu and E. Nieboer (eds). John Wiley & Sons, New York, USA.
- Odum, H.T.; W. Woucik & L. Pritchard. 2000. Heavy metals in the environment: using wetlands for their removal. Boca Raton, Lewis Publishers, 326pp.
- Ohlendorf, H.M.; J.E. Oldfield; M.K. Sarka & T.W. Aldrich. 1986. Embryonic mortality and abnormalities of aquatic birds: Apparent impacts by selenium from irrigation drain water. Sci. Total Environ. 52:49-63.
- Oliver, M.A. 1997. Soil and Human health: a review. Eur. J. Soil Sci. 48:573-592.
- Ouariti, O.; H. Gouia & M.H. Ghorbal. 1997. Responses of bean and tomato plants to cadmium: growth, mineral nutrition and nitrate reduction. Plant Physiol. Biochem. 35:347-354.
- Ouzounidou, G.; M. Moustakas & E.P. Eleftheriou. 1997. Physiological and ultrastructural effect of cadmium on wheat *Triticum aestivum* leaves. Archives of Environ. Contam. Toxicol. 32:154-160.
- Ow, D.W. 1996. Heavy metal tolerance genes: prospective tools for bioremediation. Resour. Conserv. Recyc. 18:135-149.
- Pahlsson, A.M.B. 1989. Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. Water Air Soil Pollut. 47:287-319.
- Pais, I. & J. Benton Jones. 2000. The Handbook of Trace Elements. Ed. St. Lucie Press, Boca Raton, Florida.

- Panou-Filotheou, H. & A.M. Basabalidis. 2004. Root structural aspects associated with copper toxicity in oregano (*Origanum vulgare subsp. hirtum*). *Plant Sci.* 166:1497-1504.
- Pasternak, T.; V. Rudas; G. Potters & M.A.K. Jansen. 2005. Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 53:299-314.
- Payne, G.G.; D.C. Martens; C. Winarko & N.F. Perera. 1988. Availability and form of copper in three soils following eight annual applications of copper-enriched swine manure. *J. Environ. Qual.* 17:740-746.
- Perronet, T, K.; C. Schwartz & J.L. Morel. 2003. Distribution of cadmium and zinc, in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* grown on multicontaminated soil. *Plant Soil* 249:19-25.
- Perttu, K. L. 1999. Environmental and hygienic aspects of willow coppice in Sweden. *Biomass Bioenergy* 16: 291-297
- Petruzzeli, G. 1989. Recycling wastes in agriculture: Heavy metal bioavailability. *Agr. Ecosyst. Environ.* 27:493-503.
- Petruzzelli, G.; M.Ottaviani; L. Lubrano & E. Veschetti. 1994. Characterization of heavy metal mobile species in sewage sludge for agricultural utilization. *Agrochimica.* 38:277-284.
- Pickering, W.F. 1980. Cadmium retention by clays and other soil or sediment Components. Pp 365–395. In: Nriagu JO (ed) *Cadmium in the environment. Part I. Ecological cycling.* John Wiley, New York.
- Pietz R.I.; J.R. Peterson; J.E. Prater & D.R. Zenz. 1984. Metal concentration in earthworms from sewage sludge soils at a strip mine reclamation site. *J. Environ. Qual.* 18:174-179.
- Pilon-Smits, E.A.H. 2005. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:15-39.
- Pineros, M.A.; J.V. Magalhaes; V.M. Carvalho & L.V. Kochian. 2002. The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. *Plant Physiol* 129:1194-1206.
- Prasad, M.N.V. & H.M. Freitas. 2003. Metal hyperaccumulation in plants-Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol6/issue3/full/6>.
- Prasad, M.N.V. 2004. Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems. 2<sup>nd</sup> ed. Narosa Publishing House, 22 Daryaganj, New Delhi.
- Pueyo, M.; J.F. López-Sánchez & G. Rauret. 2004. Assessment of CaCl<sub>2</sub>, NaNO<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> extraction procedures for the study of Cd, Cu, Pb and Zn extractability in contaminated soils. *Anal. Chim. Acta* 504:217-226.
- Quia, X.L; Y.M. Luo; P. Christie & M.H. Wong. 2003. Chemical speciation and extractability of Zn, Cu and Cd in two contrasting biosolids-amended clay soils. *Chemosphere* 50:823-829.
- Quian, J.; Z. Wang; X. Shan; Q. Tu; B. Wen & B. Chen. 1996. Evaluation of plant availability of soil trace metals by chemical fractionation and multiple regression analysis. *Environ. Pollut.* 91:309-315.
- Rajaie, M.; N. Karimian; M. Maftoun; J.Yasrebi & M.T. Assad. 2006. Chemical forms of cadmium in two calcareous soil textural classes as affected by application of cadmium-enriched compost and incubation time, *Geoderma* 136:533-541.
- Ramos, I.; E. Esteban; J.J. Lucena & A. Gárate. 2002. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd-Mn interaction. *Plant Sci.* 162:761-767.
- Raskin, I.; P.B.A.N. Kumar; S. Dushenkov & D. Salt. 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5:285-290.
- Raskin, I.; R.D. Smith & D.E. Salt. 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:221-226.
- Raskin, I. & B.D. Ensley (eds). 2000. *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment.* John Wiley & Sons, Inc., New York. 352 pp.

- Rauser, W.E. & E.B. Dumbroff. 1981. Effects of excess cobalt, nickel and zinc on the water relations of *Phaseolus vulgaris*. *Environ. Exp. Bot.* 21:249-255.
- Reeves, R.D. & A.J.M. Baker. 2000. Metal-accumulating plants. Pp 193–230. In: Raskin and B.D. Ensley (eds), *Phytoremediation of toxic metals using plants to clean up the environment*, John Wiley & Sons Inc. New York, USA.
- Reich, P.B.; M.G. Tjolkner; M.B. Walter; D.W. Vanderklein & C. Buschena. 1998. Close association of RGR, leaf and root morphology, seed mass and shade tolerance in seedling of nine boreal tree species grown in high and low light. *Funct. Ecol.* 12:327-338.
- Reichman, S.M.; C.J. Asher; D.R. Mulligan & N. W. Menzies. 2001. Seedling responses of three Australian tree species to toxic concentration of zinc solution culture. *Plant Soil* 235:151-158.
- Reyzábal, L.; P. Marcet & M.J. Montero. 2000. Effect of long-term cultivation on zinc and copper contents in soils from the Bahía Blanca horticultural belt (Argentina). *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 31:1155-1167.
- Robinson, B. H.; M. Leblanc; D. Petit; R.R. Brooks; J.H. Kirkman & P.E.H. Gregg. 1998. The potential of *Thlaspi caerulescens* for phytoremediation of contaminated soils. *Plant Soil* 203:47-56.
- Robinson, B.H.; R.R. Brooks; P.E.H. Gregg & J.H. Kirkman. 1999. The nickel phytoextraction potential of some ultramafic soils as determined by sequential extraction. *Geoderma* 87:293-304.
- Rogers, H.H.; S.A. Prior; G.B. Runion & R.J. Mitchell. 1996. Root to shoot ratio of crops as influenced by CO<sub>2</sub>. *Plant Soil* 187:229-248.
- Römheld, V. & H. Marschner. 1986. Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiol.* 80:175-180.
- Roosens, N.; N. Verbruggen; P. Meerts; P. Ximenez-Embun & J.A.C. Smith. 2003. Natural variation in cadmium tolerance and its relationship to metal hyperaccumulation for seven populations of *Thlaspi caerulescens* from western Europe. *Plant Cell Environ.* 26:1657-1672.
- Ross, S.M. 1994. Sources and forms of potentially toxic metals in soil-plant systems. Pp 63-152. In: Ross S.M (eds). *Toxic Metals in Soil-Plant Soil Plant Systems*, John Wiley & Sons, Chichester, U.K.
- Rotkittikhun, R; M. Kruatrachue; R. Chaiyarat; C. Ngernsarsaruay; P. Pokethitiyook; A. Pajitprapaporn & A.J.M. Baker. 2006. Uptake and accumulation of lead by plants from the Bo Ngam lead mine area in Thailand. *Environ. Pollut.* 144:681-688.
- Rout G.R.; S. Samantaray & P. Das. 1997. Differential chromium tolerance among eight mungbean cultivars grown in nutrient culture. *J. Plant Nutr.* 20:473-83.
- Rucinska, R.S.; S. Waplak & E.A. Gwozdz. 1999. Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. *Plant Physiol. Biochem.* 37:187-194.
- Rulknes, W.H.; R. Tichy & J.T.C. Grotenhuis. 1998. Remediation of polluted soil and sediment: perspectives and failures. *Water Sci. Technol.* 37:27-35.
- Ryser, P. & W.R. Sauder. 2006. Effects of heavy-metal-contaminated soil on growth, phenology and biomass turnover of *Hieracium piloselloides*. *Environ. Pollut.* 140:52-61.
- Saeed, M. & R.L. Fox. 1997. Relations between suspension pH and Zn solubility in acid and calcareous soils. *Soil Science* 124:199-204.
- Sai Kachout, S.; J.C. Leclerc; A. Ben Mansoura; M.N. Rejeb & Z. Ouerghi. 2009. Effects of Heavy Metals on Growth and Bioaccumulation of the Annual Halophytes *Atriplex Hortensis* and *A. Rosea*. *J. Appl. Sci. Res.* 5:746-756.
- Saikkonen, K.; S. Koivunen; T. Vuorisalo & P. Mutikainen. 1998. Interactive effects of pollination and heavy metals on resource allocation in *Potentilla anserina* L. *Ecology* 79:1620-1629.

- Sajwan, K.S.; W.H. Ornes; T.V. Youngblood & A.K. Alva. 1996. Uptake of soil applied cadmium, nickel and selenium by bush beans. *Water Air Soil Pollut.* 91:209-217.
- Salim, R.; M.M. Al-Subu & A. Atallah. 1993. Effects of root and foliar treatments with lead, cadmium and copper on the uptake, distribution and growth of radish plants. *Environ. Int.* 19:393-404.
- Salt, D.E.; R.C. Prince; I.J. Pickering & I. Raskin. 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol.* 109:1427-1433.
- Sandalio, L.M.; H.C. Dalurzo; M. Gómez; M.C. Romero-Puertas & L.A. del Rio. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* 52:2115-2126.
- Sanità di Toppi, L. & R. Gabbriellini. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 41:105-130.
- Sauve, S.; M.B. McBride; W.A. Norvell & W.H. Hendershot. 1997. Copper solubility and speciation of in situ contaminated soils: effects of copper level, pH and organic matter. *Water, Air Soil Pollut.* 100: 133-149.
- Sauvé, S.; W.A. Norvell; M. McBride & W. Hendershot. 2000. Speciation and complexation of cadmium in extracted soil solutions. *Environ. Sci. Technol.* 34:291-296.
- Saverbeck, D.R. & A. Hein. 1991. The Ni uptake from different soils and its prediction by chemical extractions. *Water, Air Soil Pollut.* 58: 861-871.
- Saxena, P.K.; S. KrishnaRaj; T.V. Dan; M.R. Perras & N.N. Vettakkrumakankav. 1999. Phytoremediation of heavy metal contaminated and polluted soil. Pp 305-329. In: Prasad, M.N.V. and J.Hagemeyer (eds). *Heavy Metal Stress in plants from Molecules to Ecosystem*, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Schat, H.; M. Llugany & R. Bernhard. 2000. Metal-specific patterns of tolerance, uptake and transport of heavy metals in hyperaccumulating and non hyperaccumulating metallophytes. Pp 171-200. In: Terry, N. and G. Bañuelos, (eds.) *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.
- Scheiner, J.D.; F.H. Gutierrez Boem & R.S. Lavado. 2000. Dinámica de la absorción y partición de nutrientes en soja. *Phyton* 69:77-84.
- Seo, K.W.; Y. Son; C.C. Rhoades; N.J. Noh; J.W. Ko & J.G. Kim. 2008. Seedlings growth and heavy metal accumulation of candidate woody species for revegetation Korea mine spoils. *Restor. Ecol.* 16:702-712.
- Seregin, I.V. & A.D. Kozhevnikova. 2006. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 53:257-277.
- Shanker, A.K.; C. Cervantes; H. Loza-Tavera & S. Avudainayagam. 2005. Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* 31:739-753.
- Sharma, D.C.; C.P. Sharma & R.D. Tripathi. 2003. Phytotoxic lesions of chromium in maize *Chemosphere* 51:63-68.
- Sharma, K.; K.P. Sharma & R. Grover. 2004. In vitro studies to analyze the response of some ornamental plant species to heavy metals at germination and other stages. *Nat. Environ. Pollut. Technol.* 3:369-376.
- Shen, Z.G.; X.D Li; C.C. Wang; H.M. Chen & H. Chua. 2002. Lead phytoextraction from contaminated soil with high-biomass plant species. *J. Environ. Qual.* 31: 1893-1900.
- Shuman, L.M. 1979. Zinc, manganese and copper in soil fractions. *Soil Sci.* 127:10-17.
- Shuman, L.M. 1991. Chemical forms of micronutrient in soils. Pp.113-144. In: J.J. Mortvedt y col. (eds) *Micronutrients in Agriculture*, 2<sup>nd</sup> Ed. SSSA, Madison, WI.
- Siedlecka, A. 1995. Some aspects of interaction between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Soc. Bot. (Poland)* 64:260-265.
- Siedlecka, A.; A. Tukendorf; E. Skórzynska-polit; W. Maksymiec; M. Wójcik; T. Baszynski & Z. Krupa. 2001. Angiosperms (Asteraceae, Convolvulaceae, Fabaceae and Poaceae; other than Brassicaceae). pp. 171-217. In: Prasad,

- M.N.V. (eds): Metals in Environment Analysis by Biodiversity. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Siegel, F.R. 2002. Environmental Geochemistry of potentially toxic metals. Heidelberg, Springer-Verlag. 218pp.
- Silva Gonzaga, M.I.; J.A.G. Santos & L.Q. Ma. 2006. Arsenic chemistry in the rhizosphere of *Pteris vittata* L. and *Nephrolepis exaltata* L. Environ. Pollut. 143:254-260.
- Sims, J.T. 1986. Soil pH effects on the distribution and plant availability of manganese, copper and zinc. Soil Sci. Soc. Am. J. 50:367-73.
- Sims, J.T. & J.S. Kline. 1991. Chemical fractionation and plant uptake of heavy metals in soils amended with co-composed sewage sludge. J. Environ. Qual. 20:387-95.
- Sims, J.T. & D.C. Wolf. 1994. Poultry manure management agricultural and environmental issues. Adv. Agron. 52:1-83.
- Singh, A.K. 2001 Effect of trivalent and hexavalent chromium on spinach (*Spinacea oleracea* L). Environ. Ecol. 19:807-10.
- Singh, B.R.; P.R. Narwal & A.R. Almas. 1995. Crop uptake and extractability of Cd in soils naturally high in metals at different pH levels. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 26:2123-2142.
- Singh R.P.; R.D. Tripathi; S.K. Sinha; R. Maheshwari & H.S. Srivastava. 1997. Response of higher plants to lead contaminated environments. Chemosphere 34:2467-93.
- Singh, R.P. & M. Agrawal. 2007. Effects of sewage sludge amendment on heavy metal accumulation and consequent responses of *Beta vulgaris* plants. Chemosphere 67:2229-2240.
- Singh, S.; R. Saxena; K. Pandey; K. Bhatt & S. Sinha. 2004. Responses of antioxidants in sunflower (*Helianthus annus* L.) grown on different amendments of tannery sludge: its metal accumulation potential. Chemosphere 57:1667-1673.
- Sinha, P.; B.K. Dube; P. Srivastava & C. Chatterjee. 2006. Alteration in uptake and translocation of essential nutrients in cabbage by excess lead. Chemosphere 65:651-656.
- Smilde, K.W. 1981. Heavy metal accumulation in crops grown on sewage sludge amended with heavy metals. Plant Soil 62:3-14.
- Smith, S.R. 1994 a. Effect of soil pH on availability to crops of metals in sewage sludge -treated soils. I. Ni, Cu and Zn uptake and toxicity to Reygrass. Environ. Pollut. 85:321-327.
- Smith, S.R. 1994 b. Effect on soil pH on availability of metals in sewage sludge treated soil cadmium uptake by crops and implications for human dietary intake. Environ. Pollut. 86:5-13.
- Song, Y.; M.J. Wilson; H.S. Moon; J.R. Bacon & D.C. Bain. 1999. Chemical and mineralogical forms of lead, zinc and cadmium in particle size fractions of some wastes, sediments and soils in Korea. Appl. Geochem. 14:621-633
- Sparks, D.L. (eds) 1996. Methods of Soil Analysis. Part 3. SSSA Book Ser.5. SSSA, Madison.W.I.
- Sridhar, B.B.M.; S.V. Diehl; F.X. Han; D.L. Monts & Y. Su. 2005. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). Environ. Exp. Bot. 54:131-141.
- Stover, R.; L. Sommers & D. Silviera, 1976. Evaluation of metals in wastewater sludge. J. Water Pollut. Control Fed. 48:2165-2175.
- Stoyanova, Z. & S. Doncheva. 2002. The effect of zinc supply and succinate treatment on plant growth and mineral uptake in pea plant, Braz. J. Plant Physiol. 14:111-116.
- Stratford H.K.; T.H. William & A. Leon. 1984. Effects of heavy metals on water hyacinths (*Eichhornia crassipes*). Aquat. Toxicol. 5:117-28.

- Sutherland, R.A. 2000. A comparison of geochemical information obtained from two fluvial bed sediment fractions. *Environ. Geol.* 39:330-341.
- Symeonidis, L. & S. Karataglis. 1992. Interactive effects of cadmium lead and zinc on root growth of two metal tolerant genotypes of *Holcus lanatus* L. *Biometals* 5:173-178.
- Szefer, P.; A. Kusak; K. Szefer; H. Jankowska; M. Wolowicz & A. Ali. 1995. Distribution of selected metals in sediment cores of Puck Bay, Baltic Sea Marine Pollution Bull. 30:615-618.
- Tack, F.M.G. & M.G. Verloo. 1995. Chemical speciation and fractionation in soil and sediment heavy metal analysis: a review. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 59:225-238.
- Takagi, S.; K. Nomoto & T. Takemoto. 1984. Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. *J. Plant Nutr* 7:469-477.
- Tang, X.Y.; Y.G. Zhu; Y.S. Cui; J. Duan & L. Tang. 2006. The effect of ageing on the bioaccessibility and fractionation of cadmium in some typical soils of China. *Environ. Int.* 32:682-689.
- Tessier, A.; P.G.C. Campbell & M. Bisson. 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.* 51:844-851.
- Thiesen, M.O. & C. Blincoe. 1988. Isolation and partial characterization of nickel complexes in higher plants. *Biol. Trace Elem. Res.* 16:239-251.
- Tiller, K.G. 1989. Heavy metals in soils and their environmental significance. *Adv. Soil Sci.* 9:113-142.
- Tooke, F.; M. Ordidge; T. Chiurugwi & N. Battey. 2005. Mechanisms and function of flower and inflorescence reversion. *J. Exp. Bot.* 56:2587-2599.
- Torri, S.I. & R.S. Lavado. 2002. Distribución y disponibilidad de elementos potencialmente tóxicos en suelos representativos de la provincia de Buenos Aires enmendados con biosólidos. *Ciencia del Suelo* 20:98-109.
- Torri, S.I. & R.S. Lavado. 2009. Plant absorption of trace elements in sludge amended soils and correlation with soil chemical speciation. *Journal Hazard. Mater.* 166:1469-1465.
- Tripathi, R.M.; R. Raghunath; V.N. Sastry & T.M. Krishnamoorthy. 1999. Daily intake of heavy metals by infants through milk and milk products. *Sci. Total Environ.* 227:229-235.
- Tsiridis, V.; M. Petala; P. Samaras; S. Hadjispyrou; G. Sakellaropoulos & A. Kungolos. 2006. Interactive toxic effects of heavy metals and humic acids on *Vibrio fischeri*. *Ecotox. Environ. Safe.* 63:158-167.
- Turgut, C.; M.K. Pepe & T.J. Cutright. 2004. The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using *Helianthus annuus*. *Environ. Pollut.* 131:147-154.
- Tyler, G.; A.M. Balsberg Pahlsson; G. Bengtsson; E. Baath & L. Tranvik. 1989. Heavy-metal ecology of terrestrial plants, microorganisms and invertebrates. *Water Air Soil Pollut.* 47:189-215.
- Uhich B. 1985. Interaction of indirect and direct effects of air pollutants in forests. 149-181. In: Troyanowsky, C. (eds). *Air pollutants and plants*. Proceedings of the 2nd European Conference on Chemistry and the Environment, May 21-24 1984, Lindau, FRG. VCI Verlagsgesellschaft.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1997. *Cleaning Up the Nation's Waste Sites: Markets and Technology Trends*. EPA/542/R-96/005. Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, DC.
- Uren, N.C. 1992. Forms, reactions, and availability of nickel in soils. *Adv. Agron.* 48: 141-203.
- Usha, B; S.R. Prashanth & A. Parida. 2007. Differential expression of two metallothionein encoding genes during heavy metal stress in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Curr. Sci.* 93:1215-1219.

- Varrica, D.; G. Dongarra; G. Sabatino & F. Monna. 2003. Inorganic geochemistry of roadway dust from the metropolitan area of Palermo, Italy. *Environ.Geol.* 44:222-230.
- Verkleij, J.A., & H. Schat. 1990. Mechanisms of metal tolerance in higher plants. Pp 179-94. A.J. Shaw. (eds). In: Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects, CRC Press. Boca Raton, FL, USA.
- Walter, I. & G. Cuevas. 1999. Chemical fractionation of heavy metals in a soil amended with repeated sewage sludge application. *Sci. Total Environ.* 226:113-119.
- Wang, Z.W.; X.Q. Shan & S.Z. Zhang. 2002. Comparison between fractionation and bioavailability of trace elements in rhizosphere and bulk soils. *Chemosphere* 46:1163-1171.
- Weis, J.S. & P. Weis. 2004. Metal uptake, transport, and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. *Environ.Int.* 30:685-700.
- Whitehead, D.C. 2000. Nutrient Elements in Grasslands: Soil-Plant-Animal Relationships. CABI Publishing, Wallingford.
- WHO. 1996. Trace Elements in Human nutrition and Health. World Health organization, Geneva.
- Yadav, S.K. 2009. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *S. Afr. J. Bot.* 76:167-179.
- Yang, G.; S. Wang; R. Zhou & S. Sun. 1983. Endemic selenium intoxication of humans in China. *American Journal of Clinical Nutrition* 37:872-881.
- Yarlagadda, P.S.; M.R. Matsumoto; J.E. Vanbenschoten & A. Kathuria. 1995. Characteristics of heavy metals in contaminated soils. *J. Environ. Eng.* 121: 4276-286
- Yoon, J.; X. Cao; Q. Zhou & L.Q. Ma. 2006. Accumulation of Pb, Cu and Zn in native plants growing on contaminated Florida site. *Sci. Total Environ.* 368:456-464.
- Zayed, A.; S. Gowthaman & N. Terry. 1998. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. *J. Environ. Qual.* 27:715-721.
- Zhang, M.K.; Z.L. He; D.V. Calvert; P.J. Stoffela; X.E. Yang & Y.C. Li. 2003. Phosphorus and heavy metal attachment and release in sandy soil aggregate fractions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 67:1158-1167.
- Zhao, F.J.; E. Lombi; T. Breedon & S.P. McGrath. 2000. Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Environ.* 23:507-514
- Zhao, F.J.; R.E. Hamon; E. Lombi; M.J. McLaughlin & S.P. McGrath. 2002. Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J. Exp. Bot.* 53:535-543.
- Zhao, F.J.; E. Lombi & S.P. McGrath. 2003. Assessing the potential for Zn and cadmium phytoremediation with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil* 249:37-43.
- Zhu, B. & A.K. Alva. 1993. Distribution of trace metals in some sandy soils under citrus production. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 57:350-355.
- Zou, J.H.; M. Wang; W.S. Jiang & D.H. Liu. 2006. Effects of Hexavalent Chromium (VI) on root growth and cell division in root tip cells of *Amaranthus viridis* L. *Pak. J. Bot.* 38:673-681.
- Zubillaga, M.S. & R.S. Lavado. 2001. Biosolids compost as component of potting media for bedding plants. *Gartenbauwissenschaft* 66:304-309.
- Zubillaga, M.S. & R.S. Lavado. 2002. Efecto de la fertilización fosfatada prolongada sobre el contenido de elementos traza en un Argiudol típico. *Ciencia del Suelo* 20:110-113.