UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos

**Utilización de Sustancias Húmicas Comerciales para Optimizar
la Fitorremediación de Suelos Mineros Usando Vetiveria
(*Chrysopogon zizanioides* L. Roberty) y Verdolaga (*Atriplex
portulacoides* L.)**

TESIS DOCTORAL

CARMEN VARGAS VICTORIANO

Ingeniero Agroforestal

Máster en Contaminación Ambiental

2016

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRARIA

Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos

Departamento de Producción Agraria

Unidad de Edafología

**Utilización de Sustancias Húmicas Comerciales para Optimizar
la Fitorremediación de Suelos Mineros Usando Vetiveria
(*Chrysopogon zizanioides* L. Roberty) y Verdolaga (*Atriplex
portulacoides* L.)**

AUTORA:

Carmen Vargas Victoriano,

Ingeniero Agroforestal

DIRECTORES:

Ana Moliner Aramendía (UPM), Doctora en Ciencias Químicas

Javier Pérez Esteban (UPM), Doctor Ingeniero Agrónomo

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

AUTORIZACIÓN PARA LA DEFENSA

Ana Moliner Aramendía, profesora titular del Departamento de Producción Agraria de la Universidad Politécnica de Madrid, y Javier Pérez Esteban, Doctor Ingeniero Agrónomo Investigador de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM), como directores de la tesis doctoral titulada: “Utilización de Sustancias Húmicas Comerciales para Optimizar la Fitorremediación de Suelos Mineros Usando Vetiveria (*Chrysopogon zizanioides* L. Roberty) y Verdolaga (*Atriplex portulacoides* L.)”. Realizada por Carmen Vargas Victoriano, alumna del Programa de Doctorado de Tecnología Agroambiental para una Agricultura Sostenible, del Departamento de Producción Agraria, para aspirar al grado de Doctora por la Universidad Politécnica de Madrid.

AUTORIZAN

La presentación de esta memoria para que se proceda al trámite de su lectura y defensa ante el tribunal correspondiente. Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid, a los _____ días del mes de _____ del 2016.

Fdo.: Dra. Ana Moliner Aramendía

Fdo.: Dr. Javier Pérez Esteban

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

Tribunal nombrado por el Mgfc. y Excmo. Sr. Rector de la Universidad Politécnica de Madrid, a los _____ días del mes de _____ del 2016.

Presidente:

Secretario:

Vocal:

Vocal:

Vocal:

Suplente:

Suplente:

Realizado el acto de defensa y lectura de Tesis en Madrid, a los _____ días del mes de _____ del 2016, en la E.T.S.I. Agrónomos.

EL PRESIDENTE

EL SECRETARIO

LOS VOCALES

Esta tesis está dedicada a mis hijos, los cuales son mi razón para seguir adelante en cada meta que me he propuesto. A mis padres por estar siempre pendientes de mí.

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios por haberme dado la oportunidad de llegar hasta el final de este mi gran sueño, por darme las fuerzas necesarias para seguir adelante, por fortalecerme e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio, esta tesis doctoral, si bien ha requerido de mucho esfuerzo y dedicación por parte de la autora y sus directores de tesis, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré y muchas de las cuales han sido de mucha ayuda en momentos de angustia y desesperación por muchos inconvenientes que se presentaron durante todo el trayecto.

Agradecer hoy y siempre a mi familia porque a pesar de no estar presentes físicamente, se que procuran mi bienestar desde mi país, Republica Dominicana. A mis padres José Antonio y Lidia, a mis hijos Daniela Scarlyn, Carlos Alfredo, Carlos Vicente y Sandy Esteban, ellos han sido mi principal razón para culminar este proyecto, han sido mi soporte dándome fuerzas día a día a Raquel, la cual siempre ha estado pendiente de mi, a mis hermanas Mirian y Dayana, mis hermanos, Freddy, Franklin y Juan, a mis tías, tíos, sobrinos y sobrinas, primos y primas, porque a pesar de la distancia, el ánimo y apoyo que me brindan me han dado la fortaleza necesaria para seguir adelante. A Mis amigas Casilda, Clara, Fátima, Fe María, Janet, Letty, Laura, Maribel Lamar, Maribel Cabral, Marlyn, Miguel Angel, Irma, Kelvin, Ewddy, Sugeili, Wendy, Yokaury, Raúl, María y Bienvenido, a todos mis compañeros de trabajo en el Centro Norte (IDIAF), al personal administrativo y demás. A Glenni Llinne, que ha sido mi compañera, amiga, hermana y aunque más

joven que yo, la considero también como una madre, ya que ha estado a mi lado en cada instante, a compartido conmigo, mis buenos y malos momentos, siempre estuvo muy pendiente de mí, ella ha sido una de las persona clave, por la cuales yo he llegado hasta aquí.

Quiero expresar mi gratitud y admiración a mis directores de tesis, Dra. Ana Moliner y al Dr. Javier Pérez, por la colaboración, paciencia, apoyo brindados desde siempre, gracias a ellos se pudo realizar esta tesis doctoral. Un agradecimiento especial al Dr. Alberto Masaguer. A todos mis compañeros doctorandos, Irene, Clara, Paloma, al personal técnico del departamento, Gregorio y Alfredo, que siempre estuvieron colaborando conmigo en los trabajos de laboratorio. También quiero expresar mi agradecimiento a Jonatan, a mis amigos Claudia, Vanessa y Jorge, por brindarme su amistad sincera y estar siempre pendientes de mí. De igual manera mi más sincero agradecimiento al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF), así también al Ministerio de Educación Superior Ciencia Y Tecnología (MECSYT), al Banco Santander, a la Universidad Politécnica de Madrid (UPM), al IMIDRA (El Encín) por su colaboración en este proyecto, a todo el personal de la Facultad de Ingenieros Agrónomos, al departamento de Edafología como de Secretaría, Dirección, Recepción, Post-Grado, Administración, Biblioteca, Mantenimiento, Limpieza y Fotocopias, ya que dentro de los ámbitos que a cada uno le competen siempre han colaborado. En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral.

Índice general

Resumen	1
Abstract.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. La minería metálica.....	8
1.2. Efectos de los metales pesados en el suelo	10
1.3. Metales pesados considerados en el trabajo	12
1.4. Legislación sobre suelos contaminados	16
1.5. Técnicas de remediación de suelos.....	20
1.6. Fitoextracción de metales pesados.....	23
1.7. Acumulación de metales en las plantas.....	27
1.8. Especies hiperacumuladoras y tolerantes de metales	28
1.8.1. <i>Vetiveria (Chrysopogon zizanioides (L.) Roberty)</i>	29
1.8.2. <i>Verdolaga (Atriplex portulacoides L.)</i>	35
1.9. Sustancias húmicas	37
1.9.1. <i>Estructura de las Sustancias húmicas</i>	42
1.9.2. <i>Interacción de las sustancias húmicas con metales</i>	43
1.9.3. <i>Utilización de las sustancias húmicas</i>	45
1.9.4. <i>Sustancias húmicas comerciales</i>	50
1.9.5. <i>Estabilidad de los complejos órgano-metálicos.</i>	50

2. OBJETIVOS	57
2.1. Objetivo general.....	57
2.2. Objetivos específicos	57
3. MATERIALES Y MÉTODOS	61
3.1. Origen de las muestras de suelo estudiadas: Localización, descripción y climatología	61
3.2. Recolección y manejo de muestras de suelo.....	66
3.3. Propiedades de las sustancias húmicas comerciales utilizadas:	69
3.4. Análisis físico y químico de los suelos	69
3.4.1. <i>Contenido de humedad</i>	70
3.4.2. <i>Textura</i>	70
3.4.3. <i>Determinación de pH</i>	71
3.4.4. <i>Conductividad eléctrica</i>	72
3.4.5. <i>Materia orgánica total</i>	72
3.4.6. <i>Carbono orgánico fácilmente oxidable</i>	73
3.4.7. <i>Determinación de la Capacidad de Intercambio Catiónico</i>	74
3.4.8. <i>Fraccionamiento de metales</i>	76
3.4.9. <i>Extracción de metales por el método Rhizo</i>	77
3.4.10. <i>Concentración total de metales pesados en los suelos</i>	78
3.5. Extracción de metales pesados: capacidad de las sustancias húmicas para movilizar metales pesados.....	78

3.6. Ensayos de cultivo en invernadero	80
3.6.1. <i>Establecimiento e Instalación</i>	80
3.6.2. <i>Diseño experimental y manejo de los ensayos</i>	81
3.6.3. <i>Muestreo de las especies vegetales</i>	82
3.6.4. <i>Determinaciones analíticas en el tejido vegetal</i>	83
3.7. Análisis de suelo (Post cultivo)	84
3.8. Análisis estadístico	84
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
4.1. Características de los suelos	87
4.1.1. <i>Textura de los suelos</i>	88
4.2. Fraccionamiento de metales en los suelos estudiados.....	89
4.3. Capacidad de extracción de metales por sustancias húmicas comerciales	92
4.3.1. <i>Extracción de metales en el suelo de La Unión</i>	93
4.3.2. <i>Extracción de metales en el suelo de El Cuadrón</i>	97
4.3.3. <i>Extracción de metales en el suelo de Garganta</i>	100
4.4. Ensayo de cultivo con vetiveria.....	104
4.4.1. <i>Propiedades de los suelos después del cultivo de vetiveria</i>	105
4.4.2. <i>Crecimiento de las plantas de vetiveria</i>	107
4.4.3. <i>Concentración de metales en los tejidos vegetales de vetiveria</i> .	110

4.4.4.	<i>Acumulación total de metales en las plantas de vetiveria</i>	121
4.5.	Ensayo de cultivo con verdolaga	126
4.5.1.	<i>Propiedades de los suelos después del cultivo de verdolaga</i>	126
4.5.2.	<i>Crecimiento de las plantas de verdolaga</i>	128
4.5.3.	<i>Concentración de metales en tejidos vegetales de verdolaga</i>	131
4.5.4.	<i>Acumulación total de metales en las plantas de verdolaga.....</i>	140
5.	CONCLUSIONES	149
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153

Índice de tablas

Tabla 1. Valores de concentración de metales pesados en los suelos (mg kg^{-1} de materia seca de suelos de pH 6-7)	17
Tabla 2. Niveles genéricos de referencia de metales pesados y otros elementos traza en el suelo (mg kg^{-1}) en función de su uso para la protección de la salud humana, según la Orden 2770/2006 de la Comunidad de Madrid BOCM (2006).....	19
Tabla 3. Rangos climáticos de adaptabilidad de vetiveria	31
Tabla 4. Rango de adaptabilidad de vetiveria a las características del suelo	32
Tabla 5. Niveles umbrales de metales pesados para el crecimiento de vetiveria	32
Tabla 6. Concentraciones de metales pesados acumulados en las raíces y brotes de vetiveria	34
Tabla 7. Composición elemental de las Sustancias húmicas.	41
Tabla 8. Distribución de grupos funcionales en las sustancias húmicas.	41
Tabla 9. Propiedades de las sustancias húmicas comerciales.	69
Tabla 10. Sustancias húmicas en solución extractante.	80
Tabla 11. Propiedades químicas de los suelos y metales totales.....	87
Tabla 12. Textura de los suelos.....	88
Tabla 13. Fraccionamiento de metales (método Tessier <i>et al.</i> , 1979) en el suelo de La Unión	89
Tabla 14. Fraccionamiento de metales (método Tessier <i>et al.</i> , 1979) en el suelo de El Cuadrón.....	90

Tabla 15. Fraccionamiento de metales (método Tessier <i>et al.</i> , 1979) en el suelo de Bustarviejo.	91
Tabla 16. Fraccionamiento de metales (método Tessier <i>et al.</i> , 1979) en el suelo de Garganta de los Montes.....	91
Tabla 17. Extracción acumulada de metales en el suelo de La Unión con SH _L (mg kg ⁻¹)	97
Tabla 18. Extracción acumulada de metales en el suelo de El Cuadrón con SH _L (mg kg ⁻¹)	100
Tabla 19. Extracción acumulada de metales en el suelo de Garganta con SH _L (mg kg ⁻¹)	103
Tabla 20. Propiedades de los suelos después del cultivo de vetiveria	105
Tabla 21. Factor de translocación (FT) y factor de bioconcentración (FB) de metales en vetiveria cultivada en los diferentes tratamientos.	119
Tabla 22. Propiedades de los suelos después del cultivo de verdolaga	127
Tabla 23. Factor de translocación (FT) y factor de bioconcentración (FB) de metales en verdolaga cultivada en los diferentes tratamientos.....	138

Índice de figuras

Figura 1. Tipos de fitorremediación, en donde se indica la zona de la planta en donde ocurre el proceso	21
Figura 2. Esquema general de la fitoextracción.....	23
Figura 3. Vetiveria (<i>Chrysopogon zizanioides</i> (L.) Roberty).....	30
Figura 4. Verdolaga (<i>Atriplex portulacoides</i> L.).....	36
Figura 5. Esquema de fracciones orgánicas en el suelo.....	38
Figura 6. Clasificación de los componentes de la materia orgánica del suelo.....	39
Figura 7. Fraccionamiento de las sustancias húmicas (I).	40
Figura 8. Fraccionamiento de las sustancias húmicas (II).	40
Figura 9. Estructura de un ácido húmico.	42
Figura 10. Zonas de estudio.	61
Figura 11. Zona minera de Bustarviejo.....	62
Figura 12. Zona minera de El Cuadrón.....	63
Figura 13. Zona minera Garganta de Los Montes.	64
Figura 14. Zona minera de La Unión.	65
Figura 15. Localización del punto de muestreo en la Mina de la Plata de Bustarviejo.	67
Figura 16. Lugar donde se tomaron las muestras del suelo de El Cuadrón	67
Figura 17. Área donde se tomaron las muestras de suelo en la mina “Fernandito” situada en Garganta de los Montes.....	68

Figura 18. Localización del punto de muestreo en las proximidades de Mina Iberia situada en el complejo minero de Cabezo Rajao en La Unión (Región de Murcia).....	68
Figura 19. pH-metro y conductímetro.	72
Figura 20. Procedimiento para extraer metales pesados con sustancias húmicas comerciales.	80
Figura 21. Simbologías utilizadas en los ensayos.	81
Figura 22. Leyenda de los gráficos de extracción de metales con diferentes dosis de sustancias húmicas	94
Figura 23. Extracción de cobre en el suelo de La Unión, con soluciones de distintas dosis de sustancias húmicas..	94
Figura 24. Extracción de cinc en el suelo de La Unión, con soluciones de distintas dosis de sustancias húmicas..	95
Figura 25. Extracción de cadmio en el suelo de La Unión, con soluciones de distintas dosis de sustancias húmicas..	95
Figura 26. Coloración de los extractos realizados con soluciones de SH _L del suelo de La Unión	97
Figura 27. Extracción de cobre en el suelo de El Cuadrón, con soluciones de distintas dosis de sustancias húmicas.	98
Figura 28. Extracción de cinc en el suelo de El Cuadrón, con soluciones de distintas dosis de sustancias húmicas.	98
Figura 29. Extracción de cadmio en el suelo de El Cuadrón, con soluciones de distintas dosis de sustancias húmicas.	99

Figura 30. Coloración de los extractos realizados con soluciones de SH _L del suelo de El Cuadrón.	99
Figura 31. Extracción de cobre en el suelo de Garganta, con soluciones de distintas dosis de sustancias húmicas, tanto sólida como líquida.....	101
Figura 32. Extracción de cinc el suelo de Garganta, con soluciones de distintas dosis de sustancias húmicas.	102
Figura 33. Extracción de cadmio en el suelo de El Cuadrón, con soluciones de distintas dosis de sustancias húmicas, tanto sól.	102
Figura 34. Coloración de los extractos realizados con soluciones de SH _L del suelo de Garganta	103
Figura 35. Peso seco de las raíces de vetiveria al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos.....	108
Figura 36. Peso seco total de la parte aérea (suma de los 3 cortes) de vetiveria al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos.	108
Figura 37. Concentración de Cu en las raíces de vetiveria al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos.....	110
Figura 38. Concentración de Cu en la parte aérea de vetiveria en los 3 cortes realizados durante el ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos.	114
Figura 39. Concentración de Zn en las raíces de vetiveria al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos.....	115
Figura 40. Concentración de Zn en la parte aérea de vetiveria en los 3 cortes realizados durante el ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos..	116
Figura 41. Acumulación total de Cu en las raíces de vetiveria al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos.....	122

Figura 42. Acumulación total de Cu en la parte aérea (suma de los 3 cortes) de vetiveria al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos.....	122
Figura 43. Acumulación total de Zn en las raíces de vetiveria al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos.....	124
Figura 44. Acumulación total de Zn en la parte aérea (suma de los 3 cortes) de vetiveria al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos.....	125
Figura 45. Peso seco de las raíces de verdolaga al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos.....	128
Figura 46. Peso seco de la parte aérea de verdolaga al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos.....	129
Figura 47. Concentración de Cu en las raíces de verdolaga al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos.....	131
Figura 48. Concentración de Cu en la parte aérea de verdolaga al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos.	132
Figura 49. Concentración de Zn en las raíces de verdolaga al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos.....	134
Figura 50. Concentración de Zn en la parte aérea de verdolaga al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos.	135
Figura 51. Acumulación total de Cu en las raíces de verdolaga al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos.	141
Figura 52. Acumulación total de Cu en la parte aérea de verdolaga al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos.	142
Figura 53. Acumulación total de Zn en las raíces de verdolaga al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos.	143

Figura 54. Acumulación total de Zn en la parte aérea de verdolaga al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos.	143
---	-----

Resumen

Los suelos de las zonas mineras en España presentan frecuentemente un elevado nivel de contaminación por metales pesados. Tradicionalmente se han utilizado técnicas de descontaminación muy agresivas para el medio edáfico que produce alteraciones de las características del suelo e impiden su recuperación o rehabilitación. La fitorremediación es un conjunto de técnicas más económicas y respetuosas con el medio ambiente que las convencionales donde se utilizan plantas en combinación con determinadas enmiendas y prácticas agronómicas para reducir la toxicidad de los contaminantes. Entre estas técnicas, se encuentra la fitoextracción, basada en la absorción de los metales del suelo por las raíces de las plantas y en su translocación a la parte aérea cosechable. La especie vetiveria (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty) es comúnmente conocida por su eficacia como barrera para el control de la erosión, por tolerar condiciones extremas en suelos y por producir una gran cantidad de biomasa incluso en zonas contaminadas, mientras que la especie verdolaga (*Atriplex portulacoides* L.), especie arbustiva y halófila, se desarrolla en suelos con amplio rango de condiciones de pH, pudiendo llegar a soportar terrenos muy salinos y pobres en nutrientes. El presente trabajo estudia la posibilidad de recuperación de suelos expuestos a una elevada contaminación por metales pesados mediante fitoextracción asistida por agentes quelantes. Se analizó el efecto de sustancias húmicas comerciales, procedentes de leonardita sobre la solubilidad de los metales Cu, Cd, Pb y Zn en tres suelos mineros mediante curvas de desorción secuencial utilizando disoluciones con

diferentes concentraciones de las sustancias húmicas. Posteriormente se utilizaron dichas sustancias para un estudio en macetas, con idea de aumentar la disponibilidad de metales y promover su fitoextracción por las plantas de *Chrysopogon zizanioides* y *Atriplex portulacoides*. Para ello, se instaló un ensayo bajo ambiente controlado en macetas, utilizando tres suelos provenientes de las zonas mineras de La Unión (Murcia), El Cuadrón y Bustarviejo (Madrid). Se utilizó un diseño factorial con tres niveles de aplicación de ácido húmico: 0, 2, 10 y 20 g kg⁻¹ de suelo con diez repeticiones. Se evaluó el crecimiento alcanzado por las plantas y la cantidad de metales (Cu, Cd, Pb y Zn) extraída y acumulada por ambas especies en los diferentes tratamientos con sustancias húmicas. Los resultados obtenidos de las curvas de desorción con los compuestos húmicos comerciales mostraron que las sustancias húmicas aumentan la movilidad de los metales en el suelo de El Cuadrón con relativamente bajo contenido en metales pesados. Sin embargo, en suelos con mayor nivel de contaminación, como en el de La Unión, y aplicadas en dosis más elevadas provocan cierta inmovilización. En los ensayo en macetas, se observó que vetiveria y verdolaga resultaron ser más adecuadas para técnicas de fitoestabilización que para fitoextracción. La utilización de estas especies en combinación con altas dosis de sustancias húmicas comerciales consiguió mejorar el crecimiento de las plantas y promover la absorción y acumulación de cobre en las raíces, lo que es útil para fitoestabilización.

Palabras claves: metales pesados, vetiveria, verdolaga, sustancias húmicas, leonardita, contaminación de suelos.

Abstract

Soils from mining areas in Spain often contain high levels of heavy metal contamination. Traditionally, decontamination techniques that result very aggressive for soils have been used. These techniques can produce alterations in the soil characteristics and hinder its recovery and rehabilitation. Phytoremediation is a set of techniques more economical and environmentally friendly than the conventional ones, which mixes plants with certain amendments and agronomic practices to reduce the toxicity of pollutants. Among these techniques, we can highlight phytoextraction, which is based on the absorption of metals from the soil by plant roots and translocation to the aerial parts of plants. Vetiver (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty) species is commonly known for its effectiveness as a barrier to control erosion, for its tolerance in soils with extreme conditions and its capacity to produce a large biomass even in contaminated areas. On the other hand, purslane (*Atriplex portulacoides*), a halophyte shrub species, does well in soils with a wide range of pH conditions, being able to withstand highly saline soils and poor in nutrients. This work studies the possibility of recovery of soils exposed to high contamination with heavy metals by phytoextraction techniques assisted by chelating agents. The effect of commercial humic substances, obtained from leonardite, on the solubility of the metals Cd, Cu, Pb and Zn in three mine soils through analyzed sequential desorption procedure using extracting solutions with different concentrations of these substances. After that, the humic substances were used in a pot experiment in order to increase metal availability

and to improve phytoextraction capacity of *Chrysopogon zizanioides* and *Atriplex portulacoides* plants. This essay consisted on installing containers under greenhouse conditions using three different soils from the mining areas of La Unión (Murcia), El Cuadrón, and Bustarviejo (Madrid). A factorial design was used with three levels of humic substances application: 0, 2, 10 and 20 g kg⁻¹ of soil with ten replications. The biomass development and the amount of metals (Cu, Cd, Pb and Zn) extracted and accumulated by plants in the different treatments with humic substances were evaluated. Results obtained from the desorption study showed that the humic substances increased metal mobility in the soil of El Cuadrón with relatively low heavy metal content. However, in more contaminated soils with higher levels of humic substances there was immobilization of heavy metals. In the pot experiments, it was observed that vetiver and purslane resulted more suitable for phytostabilization than for phytoextraction techniques. The use of these species in combination with commercial humic substances applied at high rates managed to improve plant growth and to enhance uptake and accumulation of copper in roots, which is useful for phytostabilization.

Keywords: heavy metals, vetiver, purslane, humic substances, leonardite, soil contamination.

1. INTRODUCCIÓN

1.INTRODUCCIÓN

El crecimiento progresivo de la población mundial y el avance e intensificación de las actividades industriales desde el siglo XIX supusieron un abandono del medio ambiente y un constante incremento de la contaminación ambiental. Los países generaban más residuos (muchos no biodegradables) provocando su acumulación en el medio ambiente (Cabrillo, 1994). España históricamente ha tenido un potente sector minero y ha sido un país en el que han tenido lugar muchas y variadas actividades extractivas. La normativa respecto a los residuos generados por esta actividad no se ha desarrollado hasta muy recientemente y fue impulsada por accidentes como el de la Mina de Aznalcóllar (Antón-Pacheco *et al.*, 1999) en Andalucía, que causó graves daños ambientales, o los impactos ecológicos de la magnitud de los producidos en la Bahía de Portman, en la Comunidad de Murcia.

La actividad específicamente minera en España ha quedado reducida en los últimos años al sector del carbón y el de las rocas industriales. La extracción de minerales metálicos ha sufrido un proceso de reducción desde la segunda mitad del siglo XX y hoy día es casi insignificante. Sin embargo, no se puede olvidar que la minería metálica desarrollada en España a lo largo de los siglos ha dejado ingentes masas de residuos, acumulados en depósitos, escombreras, presas, balsas, que es necesario abordar llevando a cabo la recuperación de los suelos contaminados por dicha actividad (Moran, 2001).

1.1. La minería metálica

La minería metálica deja suelos mineros con un elevado nivel de contaminación por metales pesados, los cuales se redistribuyen y reparten lentamente entre los componentes de la fase sólida. Dicha redistribución se caracteriza por una rápida retención inicial y posteriores reacciones lentas, dependiendo del tipo de metal, de las propiedades del suelo y del tiempo en que ha estado acumulado (Ginocchio y Baker 2004). Estos suelos se degradan o se pierden irreversiblemente, debido a que los metales tienden a acumularse en la superficie del suelo quedando accesibles al consumo de los cultivos (Carpena y Bernal 2007).

Las características del suelo juegan un papel importante en reducir o aumentar la toxicidad de los metales en el mismo. Una vez en el suelo, los metales pueden quedar retenidos en el mismo, pero también pueden ser movilizados en la solución del suelo mediante diferentes mecanismos biológicos y químicos (Puga *et al.*, 2006). El establecimiento de una cubierta vegetal es uno de los métodos más ecológicos y menos costosos de recuperar suelos afectados por actividad minera.

Se considera que existe contaminación del suelo cuando la composición del mismo se desvía de su composición “normal”, denominado nivel o fondo biogeoquímico (Carpena y Bernal 2007). También, se define la contaminación del medio como la presencia de algún constituyente causado por la actividad humana, en una concentración tal que afecta negativamente a su funcionamiento y a los organismos vivos presentes en él.

Los metales pesados en el suelo, suponen un riesgo por su lixiviación hacia aguas superficiales y subterráneas, absorción por las plantas, y finalmente, el paso a la cadena trófica. Cuando se dan niveles muy altos de biodisponibilidad, tanto los elementos esenciales (Cu, Zn, Mn, Fe, B, Ni, Mo) como los no esenciales (Cd, Pb, Hg, Cr) pueden ser tóxicos (Puga *et al.*, 2006). Excesivas concentraciones de metales en el suelo podrían impactar la calidad de los alimentos, la seguridad de la producción de cultivos y la salud del medio ambiente, ya que estos se mueven a través de la cadena alimenticia vía consumo de plantas por animales y estos a su vez por humanos.

El término de “**metal pesado**” se refiere a aquellos metales de la tabla periódica cuyo peso específico es superior a 5 g cm^{-3} o que tienen un número atómico por encima de 20, excluyendo generalmente a los metales alcalinos y elementos alcalinotérreos (Prieto Méndez *et al.*, 2009). Resulta algo impreciso si se tienen en cuenta las propiedades físico-químicas de los elementos, especialmente las propiedades iónicas que definen su capacidad y las propiedades biológicas (Alarcón-Corredor, 2009). Se han utilizado otros términos como “metal tóxico” o “elemento traza”, sin que ninguno de ellos se refiera a los mismos elementos, resultando igualmente poco satisfactorios. En cualquier caso el término de “metal pesado” puede ser utilizado de una forma globalizadora para referirse a aquellos metales clasificados como contaminantes ambientales (Prieto Méndez *et al.*, 2009). Además de la actividad minera, la actividad industrial puede contaminar el suelo por vía aérea, a través de deposición de material particulado y emisiones gaseosas, a través de aguas residuales como ocurre con la minería de cobre, industria

automotriz, industria de la celulosa, galvanoplastia entre otras (Díaz Suárez y Páez Pérez, 2011). Asimismo, ciertas prácticas agrícolas, pueden contaminar el suelo con metales pesados a través de la aplicación de fertilizantes que contienen trazas de metales pesados (ejemplo: fosfato), de plaguicidas con metales, lodos de aguas residuales entre otros (De la Rosa-Pérez *et al.*, 2007).

1.2. Efectos de los metales pesados en el suelo

Los suelos de minas se degradan o se pierden irreversiblemente. El “nuevo suelo” sufre un grave impacto durante la explotación minera, es frecuentemente inestable, y está formado por materiales poco aptos para el desarrollo de las actividades biológicas y los procesos formadores de suelo (Becerril Soto *et al.*, 2007). Incluso después de desaparecida la actividad minera estas condiciones adversas persisten durante mucho tiempo por el bajo nivel de materia orgánica y nutrientes, elevada y periódica erosión, gran fluctuación de temperatura superficial, sequía, condiciones de pH, etc. (Rondón y Vidal 2005).

La consecuencia directa de esta contaminación del suelo es una ausencia inicial de vegetación o la pérdida de su productividad, la disminución de la biodiversidad e indirectamente la contaminación del aire, aguas superficiales y subterráneas. Sin embargo, las poblaciones de una gran variedad de especies de plantas son capaces de colonizar estos suelos degradados por actividades mineras, si les damos la oportunidad y el tiempo necesario; son las especies metalofitas (Wong, 2003).

Las metalofitas son especies de plantas que han desarrollado los mecanismos fisiológicos para resistir, tolerar y sobrevivir en suelos con altos niveles de metales y, por ello, son endémicas de suelos con afloramientos naturales de minerales metálicos (Salas-Luevano *et al.*, 2009). Estas particularidades botánicas tienen muy difícil su supervivencia, por una parte, por su especialización para sobrevivir en entornos contaminados con unos minerales concretos, y por otra, por su restringida persistencia en zonas no mineralizadas, además, el propio desarrollo de la minería de la zona afecta y puede eliminar la vegetación nativa durante el desarrollo continuado de la actividad, y por la deposición de materiales y residuos en la superficie del entorno (López Gutierrez *et al.*, 2001). En este caso se está perdiendo la biodiversidad de unas especies que han tardado cientos, miles o millones de años por lo que con la pérdida de estas especies habremos perdido unas herramientas biológicas fundamentales para la revegetación y la recuperación de suelos contaminados por actividades industriales y mineras (Macías, 2004).

Los suelos que quedan tras una explotación minera contienen todo tipo de materiales residuales, escombros estériles, entre otros, lo que representa graves problemas para el desarrollo de la cubierta vegetal, siendo sus características más notables las siguientes: clase textural desequilibrada, ausencia o baja presencia de la estructura edáfica, propiedades químicas anómalas, disminución o desequilibrio en el contenido de nutrientes fundamentales, ruptura de los ciclos biogeoquímicos, baja profundidad efectiva, dificultad de enraizamiento, baja capacidad de cambio, baja retención de agua y presencia de compuestos tóxicos (Puga *et al.*, 2006). Las características del

suelo juegan un papel importante en reducir o aumentar la toxicidad de los metales en el suelo. Puga *et al.* (2006) comentan que la distribución de los metales pesados en los perfiles del suelo, así como su disponibilidad está controlada por parámetros como propiedades intrínsecas del metal y características de los suelos. Los metales tienden a acumularse en la superficie del suelo quedando accesibles al consumo de las raíces de los cultivos.

Las plantas cultivadas en suelos contaminados absorben en general más oligoelementos y la concentración de éstos en los tejidos vegetales está a menudo directamente relacionada con su abundancia en los suelos, y especialmente en la solución del suelo (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Los metales acumulados en la superficie del suelo se reducen lentamente mediante la lixiviación, el consumo por las plantas, la erosión y la deflación (Mendoza-Amézquita *et al.*, 2006).

1.3. Metales pesados considerados en el trabajo

Cortés-Páez *et al.* (2015) advierten del gran peligro que supone la presencia de metales pesados en ecosistemas, tanto acuáticos como terrestres, esto debido a posible entrada en la cadena trófica, independientemente de su origen debido a su difícil eliminación. Dentro de los metales pesados, los fácilmente extraíbles en un ecosistema acuático son Mn, Zn, Cd y Pb (Magdaleno *et al.*, 2014), siendo la cantidad de metales pesados asimilables dependen de la especie y del estado de la misma (Herrera Murillo y Rodríguez Román, 2010).

En general, casi todos los metales pesados tienen una función biológica en el organismo de plantas y animales, salvo algunos, de los que se desconoce su función, por lo anteriormente expuesto, los metales estudiados en éste trabajo serán los siguientes: Cd, Cu, Pb y Zn; el Cd, no tiene una función biológica conocida, mientras que el Cu, Mn y el Zn son micronutrientes esenciales.

Cobre (Cu): es un metal de transición con número atómico 29 perteneciente al grupo XI de la tabla periódica. Las propiedades físico-químicas más relevantes son: color rojizo y brillo metálico, gran ductilidad, maleabilidad, buen conductor de electricidad. Su principal uso es la fabricación de cables y componentes electrónicos. La principal fuente de contaminación por Cu en los suelos suele ser la aplicación de productos fitosanitarios y abonos, que se acumulan en los primeros horizontes del suelo, aunque no hay que olvidar la gran fuente de contaminación que son las granjas porcinas y los lodos provenientes de las mismas. En un estudio realizado por Granados y Bornemisza (1991), se demuestra que a concentraciones altas de Cu, la estructura celular de las algas del fitoplancton se ven seriamente dañadas, así como se disminuye enormemente su tasa de división; en plantas, la presencia de Cu en solución disminuye la germinación de las semillas, supervivencia de las plántulas, afecta a su morfología y produce presencia de clorosis marcada, ya que provoca una disminución en la síntesis de la clorofila (Ginocchio y Narváez 2002). Para el organismo humano se trata de un elemento esencial, siendo necesario un aporte diario de 30–80 mg kg¹ aunque los requerimientos son superiores para recién nacidos. En el organismo se encuentra

fundamentalmente complejados con proteínas, siendo la principal la “ceruplasmina”, que participa en la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} en una etapa previa a la formación de la hemoglobina (Céspedes Miranda *et al.*, 1996). También forma parte de importantes enzimas que participan en procesos de oxidación, como por ejemplo la citocromo oxidasa, la tirosina y varias aminoxidasas (Céspedes Miranda *et al.*, 1996).

La intoxicación por Cu en humanos como consecuencia de una contaminación accidental es poco frecuente, ya que su acción emética evita una ingestión y asimilación excesiva. No obstante, el envenenamiento puede producirse por ingestión de cantidades elevadas de sales de Cu por vía oral, sobre todo en forma de sulfato, con consecuencias letales. Los síntomas de intoxicación son vómitos, hematemesis, hipertensión, ictericia, anemia hemolítica y coma. También se conocen dos enfermedades hereditarias asociadas a alteraciones en la absorción de Cu, como son la enfermedad de Menke y la de Wilson, caracterizadas por una escasa absorción del Cu y una excesiva acumulación en el hígado y cerebro (González *et al.*, 2008).

Cadmio (Cd): es uno de los metales más tóxicos que existe en nuestro planeta. Se trata de un metal blando con número atómico 48, no tiene ninguna función biológica conocida (Navarro-Aviño *et al.*, 2007). A nivel molecular, el Cd es un conocido bloqueador del calcio en la membrana plasmática, al que puede sustituir. El resultado suele ser un daño severo en el ADN y en los lípidos (Navarro-Aviño *et al.*, 2007). Además, inhibe los grupos sulfhídrico y perturba el metabolismo de los aminoácidos con átomos de azufre, así como, la acción de numerosos enzimas, como la anhidrasa carbónica, la

deshidrogenasa, o la “carboxipeptidasa”. También tiene una acción competitiva con el cinc, al que desplaza como cofactor en ciertas reacciones enzimáticas. En el medio ambiente, el Cd es potencialmente peligroso, porque es absorbido eficazmente por plantas y animales, concentrado y bioacumulado dentro de sus tejidos. La toxicidad por Cd afecta a las plantas inhibiendo la fotosíntesis y la actividad enzimática, alterando la acción estomática, el equilibrio del agua en la planta, el equilibrio iónico, y generando radicales libres (Prasad, 1995).

Plomo (Pb): es un metal de transición, con número atómico 82 que pertenece al grupo XIV en la tabla periódica. Una cualidad del Pb es que forma el ácido plúmbico, así como sales metálicas. A pesar de que se puede encontrar Pb de fuentes naturales, que suelen ser sulfuros (galena), carbonatos (cerusita), sulfatos (anglesita) o fosfatos (piromorfita), o como elementos traza en los minerales de uranio y torio, debido a que es un producto directo de la descomposición radiactiva de ambos, la principal fuente es la antropogénica, debido al uso de gasolinas, minería, fundiciones, fabricación y empleo de pinturas, baterías, tuberías, etc. Otra forma de encontrar Pb es a través de aleaciones con metales como estaño, cobre, arsénico, antimonio, bismuto, cadmio, o en forma de tetraetilo de Pb o en forma de óxidos. La presencia de un exceso de Pb en el medio ambiente interviene en los ecosistemas marinos afectando a su base, ya que las funciones del fitoplancton se ven perturbadas, en los crustáceos, se acumula en la concha, afectando a largo plazo a la composición de la arena de las playas (Prieto Méndez *et al.*, 2009). En plantas, la toxicidad por Pb se expresa en la inhibición de la actividad de las enzimas, desequilibrio en la absorción de agua y baja permeabilidad de la membrana

plasmática, además de la disminución de la germinación de las semillas y el no crecimiento de las raíces.

Cinc (Zn): es un elemento metálico que tiene de número atómico 30, está situado en el grupo XII en la tabla periódica, a veces clasificado como metal de transición aunque estrictamente no lo sea, ya que tanto el metal como su especie dispositiva presentan el conjunto orbital completo. Este elemento presenta cierto parecido con el Mg y con el Cd de su grupo, pero del Hg se aparta mucho por las singulares propiedades físicas y químicas de éste. Es el vigesimotercer elemento más abundante en la tierra y una de sus aplicaciones más importantes es el galvanizado del acero. El aire seco no le ataca pero en presencia de humedad se forma una capa superficial de óxido o carbonato básico que aísla al metal y lo protege de la corrosión. Prácticamente el único estado de oxidación que presenta es el +2 (Ducceschi *et al.*, 2001). La toxicidad por Zn sólo se expresa en suelos ácidos (Martín Moreno *et al.*, 2004).

1.4. Legislación sobre suelos contaminados

La preocupación por los efectos de la contaminación del suelo es relativamente reciente y muy posterior a la consideración de las repercusiones de las actividades humanas sobre el aire y el agua. La Carta Europea de Suelos del Consejo de Europa de 1972 ya considera el suelo como un recurso no renovable que necesita protección frente a su degradación. En 1986 se produce la primera directiva europea dedicada a la protección del suelo, la directiva 86/278/CEE, relativa a la protección del medio ambiente y en particular de los suelos, en la utilización de lodos de depuradora en agricultura DOCE, 1986. En el Anexo I A de esta directiva se establecen los valores límite

de concentración de metales pesados por encima de los cuales se considera la prohibición de aplicar lodos de depuradora. Esta directiva se traspuso a la legislación española en el Real Decreto 1310/1990 (BOE, 1990).

La Tabla 1 muestra los valores de concentración de metales pesados en los suelos (mg kg^{-1} de materia seca de suelos de pH 6-7) del Anexo 1 A de la directiva europea 86/278/CEE (DOCE, 1986).

Tabla 1. Valores de concentración de metales pesados en los suelos (mg kg^{-1} de materia seca de suelos de pH 6-7)

Metales	Valores límite
Cadmio	1 – 3
Cobre	50 – 140
Níquel	30 – 75
Plomo	50 – 300
Cinc	150 – 300
Mercurio	1 – 1,5

En España, la preocupación por la contaminación del suelo se puso por primera vez de manifiesto en el Plan Nacional de Recuperación de Suelos Contaminados (BOE, 1995) para los años 1995-2005. En este Plan se contemplaron actuaciones en 274 puntos graves detectados en todo el territorio nacional de los 4532 emplazamientos inventariados como suelos potencialmente contaminados. En 1998 fue aprobada una nueva Ley de Residuos, la Ley 10/1998 (BOE, 1998). Esta ley engloba y actualiza la normativa anterior relativa a este tema y que contempla por primera vez en la legislación española la gestión de suelos contaminados. Esta ley regula los aspectos ambientales de los suelos contaminados y dispone que el Gobierno, previa consulta a las comunidades autónomas determine los criterios

estándares que permitan evaluar los riesgos que pueden afectar a la salud humana y al medio ambiente atendiendo a la naturaleza y a los usos del suelo.

En el Real Decreto 9/2005 (BOE, 2005) se da cumplimiento a la Ley 10/1998 de Residuos y se establece una relación de actividades susceptibles de causar contaminación en el suelo, así como la adopción de criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. Este Real Decreto define como Nivel Genérico de Referencia (NGR) a “la concentración de una sustancia contaminante en el suelo que genera el mayor nivel de riesgo admisible para la salud humana y en su caso, los ecosistemas, calculada para uno de los supuestos usos genéricos del suelo”. En los Anexos V y VI de este Real Decreto se establecen los NGR de los contaminantes orgánicos y deja a las Comunidades Autónomas que fijen los niveles y criterios en relación con los metales pesados.

En la Comunidad de Madrid se promulgó en 1999 el Decreto 326/1999 (BOCM, 1999) para establecer el régimen jurídico de los suelos contaminados situados en el ámbito competencial de la Comunidad de Madrid, así como para crear y regular el Inventario de los Suelos Contaminados de la Comunidad de Madrid. Posteriormente, se elaboró el Plan Regional de Suelos Contaminados para los años 2006-2016 con el objeto de determinar las actuaciones en materia de suelos contaminados. En la Orden 2770/2006 (BOCM, 2006) se establecieron los niveles genéricos de referencia para metales y otros elementos traza en los suelos contaminados de la Comunidad de Madrid obtenidos mediante la aplicación de los criterios del anexo VII del Real Decreto 9/2005 (Tabla 2).

Tabla 2. Niveles genéricos de referencia de metales pesados y otros elementos traza en el suelo (mg kg^{-1}) en función de su uso para la protección de la salud humana, según la Orden 2770/2006 de la Comunidad de Madrid BOCM (2006).

Elemento	Industrial	Urbano	Otros usos
Antimonio	80	8	0,8
Arsénico	40	24	24
Bario	100.000	15.200	4.200
Berilio	13	2	2
Cadmio	300	30	3
Cobalto	1.500	150	15
Cobre	8.000	800	80
Cromo total	2.300	230	90
Estaño	100.000	46.730	46.730
Manganeso	33.900	3.90	690
Mercurio	15	7	5
Molibdeno	1.500	150	15
Níquel	15.600	1.560	405
Plata	500	50	5
Selenio	3.900	390	85
Plomo	2.700	270	75
Talio	30	3	2
Vanadio	3.700	370	37
Cinc	100.000	11.700	1.170

En 1997 se elaboró el Inventario de Suelos Potencialmente Contaminados de la Comunidad de Madrid. El resultado fue la caracterización de un total de 135 emplazamientos, de los cuales 66 quedaron inventariados como “caracterizados y con indicios de contaminación”. De estas localizaciones, cerca de un 60% se encontraban en zonas industriales, un 20% en zonas de vertido incontrolado, un 20% en vertederos y menos del 1% en antiguas zonas de extracción de gravas. En un 54% de estos emplazamientos, los principales contaminantes detectados fueron los metales pesados.

1.5. Técnicas de remediación de suelos

Entre las técnicas de remediación de suelos contaminados por metales, las más conocidas son las técnicas tradicionales, las cuales son eminentemente físico-químicas, por ejemplo: la vitrificación, el lavado de suelo, la electrocinética, etc. Aunque estas técnicas suelen ser muy eficientes en la remoción del contaminante deseado tienen la desventaja de ser muy costosas, además de alterar irreversiblemente las características originales de los suelos. Por estas razones se han buscado tecnologías más baratas, ambientalmente adecuadas y que permitan mayores opciones de uso posterior (Drescher y May 1989).

Dentro de los nuevos métodos emergentes está la fitorremediación, definida como el conjunto de técnicas que hace uso de especies vegetales para remover o dejar en formas inocuas los contaminantes. Una vez que estas plantas absorben los metales del suelo, son cosechadas, permitiendo así la remoción definitiva del contaminante. El principal requisito es que sea tolerante a altas concentraciones de metales, ya sea a uno o varios al mismo tiempo (Barceló y Poschenrieder 1992). La mayoría de las plantas no crecen en estos sitios, ya que las altas concentraciones de estos elementos son tóxicas para sus organismos. Sin embargo, existe un grupo de plantas denominadas metalofitas, que son capaces de desarrollarse en estas condiciones. Este grupo de plantas incluye a las metalofitas estrictas, es decir, aquellas que solo crecen en sitios contaminados (endémicas) y a las pseudo-metalofitas, es decir, poblaciones tolerantes de especies comunes (Ginocchio y Baker 2004).

La **fitorremediación** supone el uso de plantas para eliminar o reducir la toxicidad de los contaminantes del medio ambiente. Las tecnologías principales para la fitorremediación de metales son:

Fitoextracción: esta técnica consiste en cultivar especies que acumulan un determinado contaminante por una o varias temporadas. Posteriormente, la biomasa aérea es cosechada e incinerada y las cenizas restantes son tratadas como desechos peligrosos (Whiting *et al.*, 2004) (Figura 1). La eficiencia de un proceso de fitoextracción depende principalmente de la selección de una especie adecuada. Con este fin, se debe considerar que la capacidad de fitoextracción de una planta depende tanto de su conformación genética como de las condiciones ambientales.

Figura 1. Tipos de fitorremediación, en donde se indica la zona de la planta en donde ocurre el proceso. Fuente: Jaramillo-González (2012)

Fitovolatilización: las plantas extraen metales volátiles (As, Hg y Se) del suelo y se produce su volatilización hacia la atmósfera a través de las hojas.

Fitodegradación: degradación de los contaminantes por la acción de las plantas y microorganismos asociados a ellas.

Fitofiltración: se utilizan raíces de plantas (rizofiltración) o plántulas (blastofiltración) para precipitar y concentrar metales en aguas contaminadas

Fitoestimulación: utilización de los exudados radiculares para promover el desarrollo de microorganismos degradativos (bacterias y hongos).

Fitoestabilización: consiste en el uso de plantas para minimizar la movilidad de los metales mediante su acumulación en la raíz o su precipitación en la rizosfera (Carpena y Bernal 2007). La fitoestabilización hace uso de especies excluyentes, es decir que impiden el paso de contaminantes a su biomasa aérea, acumulándolos en sus raíces, ya sea absorbidos dentro de ellas o adsorbidos sobre su superficie. De esta forma los contaminantes quedan inmóviles en el suelo, previniéndose su dispersión y su paso a la cadena trófica. Para este proceso es preferible el uso de especies perennes, ya que así los contaminantes se mantienen continuamente estabilizados (Baker y Brooks, 1989).

Las especies metalofitas presentan un potencial enorme para el desarrollo de fitotecnologías medioambientales (rehabilitación, revegetación, fitoestabilización, fitoextracción, etc.). Hay que ser conscientes de la importancia de la caracterización fisiológica de las especies nativas de suelos metalíferos, ya que entre ellas hay unos candidatos excelentes para la conservación, restauración ecológica de minas y el desarrollo de fitotecnologías

ecológicas de bajo impacto ambiental que reducen la contaminación por metales en suelos (Becerril Soto *et al.*, 2007).

1.6. Fitoextracción de metales pesados

La fitoextracción se basa en el uso de plantas verdes para extraer metales pesados o radionucleidos del suelo y almacenarlos en la biomasa superficial (Prieto Méndez *et al.*, 2009). Las plantas pueden acumular metales pesados esenciales para su desarrollo y crecimiento como Fe, Mn, Zn, Cu, Mg, Mo y posiblemente Ni (Do Nascimento *et al.*, 2006). Además, algunas de ellas tienen la capacidad de acumular metales pesados a través de funciones biológicas poco conocidas, tales como Cd, Cr, Pb, Co, Ag, Se y Hg (Garbisu y Alkorta 2001) (Figura 2).

Figura 2. Esquema general de la fitoextracción. Fuente: Pence *et al.* (2000)

Estas plantas acumuladoras se utilizan para transportar y concentrar contaminantes (metales y orgánicos) desde el suelo hasta los brotes superficiales. En algunos casos también se cosechan las raíces (Garbisu y Alkorta 2001). Las plantas ideales para ser utilizadas en la fitoextracción deberían tener las siguientes características (Garbisu y Alkorta 2001):

- ❖ Ser tolerantes a altos niveles de contaminantes.
- ❖ Acumular altos niveles de metales en sus partes cosechables.
- ❖ Tener una alta tasa de crecimiento.
- ❖ Tener potencial para producir una gran cantidad de biomasa en el campo.
- ❖ Tener un sistema radicular profundo.

La resistencia de las plantas a los metales pesados se alcanza mediante mecanismos de evasión, entre los que se incluyen principalmente la inmovilización de metales en las raíces y en las paredes celulares. La tolerancia a los metales pesados se basa en el secuestro de iones metálicos pesados por las vacuolas, en unirlos con los ligando apropiados como ácidos orgánicos, proteínas y péptidos y en la presencia de enzimas que pueden funcionar a altos niveles de iones metálicos. Según Keller y Hammer (2005) hay dos estrategias de fitoextracción: utilizar plantas hiperacumuladoras y utilizar plantas que producen gran cantidad de biomasa. El primer paso para la aplicación de la técnica es la selección de las especies de plantas más adecuadas para los metales presentes y las características del emplazamiento. Las especies de plantas ideales para la fitorremediación de suelo contaminado es una especie vegetal que tiene un alto rendimiento y que tanto tolera como

acumula los contaminantes. Entre esas plantas tenemos la vetiveria, es un pasto que ha sido ampliamente conocido por su eficacia en el control de erosión y de sedimentos (Prieto Méndez *et al.*, 2009). Tiene una raíz fuerte que puede alcanzar hasta 3 m de profundidad, es de crecimiento rápido, y pueden sobrevivir en ambientes hostiles incluyendo sitios con niveles altos de metales (Chen *et al.*, 2004).

Fitoextracción asistida. El contaminante que se pretende extraer del suelo debe encontrarse biodisponible para que sea factible la absorción por la raíz. Para mejorar el proceso de fitoextracción, la biodisponibilidad del contaminante puede facilitarse a través de la adición de agentes acidificantes, fertilizantes o quelantes (Volke *et al.*, 2005); o considerando el suelo como un biorreactor, combinando conjuntamente la acción de los microorganismos del suelo con las plantas hiperacumuladoras. Con estos principios se consideran las estrategias de:

Fitoextracción asistida por quelantes: consiste en la adición de agentes quelantes al suelo para incrementar la solubilidad de los metales y de esta forma favorecer su acumulación en las partes cultivables de la planta. Los quelatos sintéticos tienen una alta efectividad para alcanzar ese objetivo, pero tienen un serio inconveniente en su aplicación en el campo debido a la cantidad excesiva de metales que solubilizan y el riesgo de lixiviación y contaminación de aguas subterráneas que ello conlleva. Los quelatos naturales de bajo peso molecular (como los ácidos orgánicos gálico, cítrico), además de tener una fitotoxicidad menor que los sintéticos, son capaces de inducir la eliminación neta de metales del suelo sin aumentar el riesgo de lixiviación. Do Nascimento

et al. (2006) demostraron que los ácidos orgánicos pueden ser tan eficientes como los quelatos sintéticos en la fitoextracción de metales en suelos contaminados Turan y Angin (2004), compararon los efectos sobre la disponibilidad y absorción de metales pesados en suelos, de la adición de diferentes agentes quelantes orgánicos [etilen-diamino tetra acético (EDTA), di-etilen-triamino penta-acético (DTPA), ácido cítrico (AC) y ácido húmico (AH)] en maíz y girasol. La capacidad para liberar B, Cd, Mo y Pb en suelos siguió el siguiente orden:

Para el maíz HA>CA>EDTA>DTPA,

Para el girasol HA>EDTA>CA>DTPA.

Los mismos autores concluyeron, por tanto, que la aplicación de sustancias húmicas es una estrategia eficaz para facilitar la fitoextracción de contaminantes del suelo. Investigaciones recientes han demostrado que la fitoextracción asistida por quelantes requiere una alta dosis de aplicación de agente quelante al suelo. Chen *et al.* (2008) también encontraron que al incrementar la temperatura de un suelo poli-contaminado (50-80°C durante 3 horas) tras la aplicación del agente quelante, se consigue aumentar la acumulación de metales pesados en los brotes de las plantas. Además, el riego con agua a 100°C dos días después de la adición de quelante o la irrigación con agua a 100°C, también tiene un mayor rendimiento de fitoextracción que en el caso de utilizar agua a 25°C.

Fitoextracción asistida por bioaumentación: utiliza asociaciones de plantas y microorganismos para mejorar las tasas de extracción de metales por las plantas cuando el factor limitante es la disponibilidad de metales. Los

microorganismos aumentan la biodisponibilidad al catalizar reacciones redox que producen cambios en la movilidad de los metales, y facilitan su absorción por las raíces. Además, las asociaciones de micorrizas afectan la tasa de absorción del metal. La **bioaumentación** no mejora el rendimiento de la fitoextracción tanto como los agentes quelantes, sin embargo, el riesgo ambiental que éstos últimos suponen junto con su alto coste, hacen relevante el uso de la bioaumentación en la fitoextracción.

Lebeau *et al.* (2008) analizaron las asociaciones de rizobacterias y hongos micorrícicos arbusculares con plantas hiperacumuladoras y no hiperacumuladoras y concluyeron que la bioaumentación incrementa la acumulación media de metales en los brotes. El desarrollo a gran escala de esta técnica dependerá de (i) la fiabilidad del proceso que todavía ha de ser demostrado en campo, (ii) la facilidad de ejecución, (iii) la posibilidad de limpiar los suelos poli-contaminados y (iv) la comparación económica de la planta asistida con microorganismos o no asistida.

1.7. Acumulación de metales en las plantas

La acumulación de metales pesados en las plantas inhibe o activa algunos procesos enzimáticos que afectan a su productividad tanto cualitativa como cuantitativamente: el plomo (Pb), arsénico (As), cobre (Cu), cadmio (Cd), cinc (Zn) y otros metales pesados pueden ser absorbidos por las plantas hasta concentrarse en sus tejidos a niveles tóxicos (Becerril Soto *et al.*, 2007). Tal situación puede ser una posible vía de entrada de estos metales en la cadena alimentaria humana a través del consumo de plantas, directa o indirectamente por los seres humanos (Navarro-Aviño *et al.*, 2007). La propia inmovilidad de

las plantas les obliga a desarrollar estrategias muy precisas para sobrevivir en los suelos con altos niveles de metales. La mayor parte de las especies que toleran la presencia de metales son especies que impiden su entrada en la raíz y su transporte a los tejidos fotosintéticos; son las especies exclusoras (Becerril Soto *et al.*, 2007). Las mejores pero a su vez escasas entre las tolerantes son las especies que acumulan metales en sus tejidos aéreos, incluso cuando la concentración de los metales en suelo es muy baja; son las especies hiperacumuladoras (Kidd *et al.*, 2007).

1.8. Especies hiperacumuladoras y tolerantes de metales

Las especies hiperacumuladoras de metales son potencialmente utilizables en procesos de **fitoextracción** en suelos contaminados. Sin embargo, la biomasa y el nivel de bioacumulación alcanzado por las plantas son los dos factores claves que definen la eficiencia del proceso (McGrath y Zhao 2003). Esas especies con un bajo nivel de acumulación requieren demasiado tiempo para la recuperación de un suelo.

La concentración final de metales en los tejidos aéreos depende del metal y de la especie, pudiendo llegar a superar el 2% de su peso seco. Las especies más comunes son las **hiperacumuladoras** de níquel (Ni), siendo más escasas las de cobalto (Co), cobre (Cu), cinc (Zn), cromo (Cr), plomo (Pb) y cadmio (Cd) (Kidd *et al.*, 2007). La habilidad para concentrar metales en los tejidos, se ha relacionado con una función defensiva frente al estrés biótico y con la disminución de la competencia con otras especies vegetales mediante interacción alelopática (alelopatía elemental) (Macnair, 2003). En cualquier caso estas especies deben tener garantizados unos mecanismos de tolerancia

interna para inmovilizar, fragmentar y desintoxicar los metales que llegan al interior celular. Los mecanismos más eficientes son la formación de complejos metálicos en el citosol mediante compuestos orgánicos producidos por las plantas, y la compartimentación de los metales en las vacuolas (Huitson y Macnair 2003). Los estudios de los últimos años han permitido conocer algunos de los mecanismos de tolerancia y acumulación de metales, especialmente en la especie *Thlaspi caerulescens* (Pence *et al.*, 2000), una especie **hiperacumuladora** de Cinc, considerada como una especie modelo en los estudios de tolerancia a metales y de fitoextracción (Becerril Soto *et al.*, 2007).

1.8.1.Vetiveria (Chrysopogon zizaniodes (L.) Roberty)

Vetiveria es una especie poliploide que no produce estolones ni rizomas funcionales por lo que es reproducida vegetativamente por subdivisiones de la raíz (Figura 3). En fitorremediación se utilizan cultivares estériles como: Monto, SunAHine, Karnataka, Fiji y Madupatty, de esta forma se impide que se convierta en invasora (Danh *et al.*, 2009). Vetiveria posee un sistema radical profundo, masivo y denso, compuesto por raíces finas y compactas. Puede alcanzar los 3-4 m de profundidad en el primer año de plantación y una longitud total de 7 m a los 36 meses (Jara-Peña *et al.*, 2014). Esto hace que sea muy tolerante a la sequía y muy apta para la estabilización de taludes inclinados. Además sus profundas raíces son capaces de penetrar capas compactas, permitiendo una excelente infiltración del agua en el suelo y favoreciendo un drenaje profundo. La mayoría de las raíces son muy finas, con un diámetro promedio de 0,5-1 mm (Truong, 1999). Esto da lugar a una alta superficie de contacto con las partículas del suelo y un enorme volumen de rizosfera para el

crecimiento y multiplicación de bacterias y hongos. De esta forma se ven favorecidos los procesos de descomposición, la absorción de contaminantes y la prevención de la lixiviación de los mismos a las aguas subterráneas.

Figura 3. Vetiveria (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty)

El sistema radical es vertical y con poco crecimiento de raíces laterales. Esto asegura que vetiveria no compita con el cultivo principal por agua y nutrientes. Los tallos firmes y erguidos de hasta 3 m forman una densa barrera viva permeable cuando Vetiveria se planta a corta distancia. La barrera de vetiveria actúa como un biofiltro muy efectivo de sedimentos y productos químicos agrícolas, además disminuye la velocidad del flujo de agua de esorrentía y lo dispersa, reduciendo su poder erosivo; la planta permanece erguida para flujos de agua de 0,6 m de profundidad (Truong *et al.*, 2009).

Características fisiológicas. Vetiveria tolera condiciones ambientales extremas como sequía prolongada de hasta 6 meses, inundaciones, periodos

de sumersión de más de 120 días y un rango de temperaturas de -15°C a 55°C (Truong *et al.*, 2009). Sin embargo su crecimiento es óptimo por encima de 15°C (Tabla 3).

Tabla 3. Rangos climáticos de adaptabilidad de vetiveria

Clima	Rango
Precipitación anual (mm)	450-4000
Heladas (temperatura del suelo)	-15°C
Olas de calor	55°C
Sequía (precipitación no efectiva)	11 meses

Fuente: Truong *et al.* (2009)

Una característica especial de vetiveria es la tolerancia a un gran número de condiciones extremas del suelo. Tolera niveles altos de acidez y alcalinidad en un rango de pH de 3,3 a 12,5 (Danh *et al.*, 2009) contenidos de Al y Mn del 85% de porcentaje de saturación y 578 mg kg⁻¹ respectivamente (Tabla 4) (Truong, 1999). Vetiveria puede crecer en suelos con extremada salinidad, soportando conductividades eléctricas (CE) de hasta 47,5 dS m⁻¹ siendo su salinidad umbral 8 dS m⁻¹. El crecimiento de la planta no se ve afectado por valores de sodicidad del 48% de ESP (Truong, 1999). La planta puede establecerse en suelos que contienen concentraciones elevadas de metales pesados, entre los que se incluyen As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, y Zn (Tabla 5).

Tabla 4. Rango de adaptabilidad de vetiveria a las características del suelo

Características del suelo	Niveles
Acidez (pH)	3,3-12,5
Salinidad (50% reducción rendimientos)	17,5 dS m ⁻¹
Salinidad máxima	47,5 dS m ⁻¹
Saturación con aluminio	68% - 87%
Nivel de manganeso	>578 mg kg ⁻¹
Sodicidad (PSI)	48%
Contenido en magnesio	2400 mg kg ⁻¹

Fuente: Truong *et al.* (2009)

Tabla 5. Niveles umbrales de metales pesados para el crecimiento de vetiveria

Metales pesados	En suelo	En planta
	(mg kg ⁻¹)	
Arsénico (As)	100-250	21-72
Cadmio (Cd)	20-60	45-48
Cobre (Cu)	50-100	13-15
Cromo (Cr)	200-600	5-18
Níquel (Ni)	100	>78
Mercurio (Hg)	>6	>0,12
Plomo (Pb)	>1500	78
Selenio (Se)	>74	>11
Cinc (Zn)	>750	880

Fuente: Truong (1999)

Sólo pequeñas cantidades de arsénico, cadmio, cromo y mercurio se traslocan a los brotes (1-6%). Una proporción moderada de cobre y níquel se transfieren a los brotes (16-30%). Mientras que el selenio, plomo, y cinc son distribuidos casi por igual entre la parte aérea y raíz (44-47%). Vetiveria tiene un gran potencial para absorber nutrientes disueltos como el N y el P en aguas residuales contaminadas. Un estudio llevado a cabo con islas flotantes de vetiveria, en un río contaminado por aguas domésticas cuyo contenido inicial

de N y P es de 9,1 y 0,3 mg L⁻¹ respectivamente, demostró que tras 4 semanas de ensayo el N total se redujo un 71-74% y el P un 98%, además se consiguió mejorar la transparencia del agua (Zheng *et al.*, 1997).

Se han realizado otros experimentos para determinar el límite máximo de tolerancia en la aplicación de N y P. Wagner *et al.* (2003) mostraron que el crecimiento de vetiveria responde positivamente a suministros de N de hasta 6000 kg ha⁻¹ año⁻¹ y no muestra efectos adversos en el crecimiento aparente hasta los 10.000 kg de N ha⁻¹ año⁻¹; para el P no se observaron respuestas en el crecimiento hasta tasas superiores a 250 kg ha⁻¹ año⁻¹, y se vio afectada negativamente en dosis de P de 1000 kg ha⁻¹ año⁻¹. Vetiveria es altamente resistente a herbicidas y plaguicidas, esto permite su uso para la remediación de agroquímicos. La atrazina y el diuron, herbicidas utilizados para el control de gramíneas y malezas de hoja ancha en numerosos sistemas de cultivo, persisten en el medio durante varios meses causando efectos adversos sobre los ecosistemas acuáticos. Danh *et al.* (2009) han demostrado que el crecimiento de vetiveria no se ve afectado negativamente por la aplicación de estos herbicidas en concentraciones de 2.000 mg L⁻¹. Otra característica destacable de vetiveria, que supone una ventaja para el tratamiento de aguas contaminadas, es su elevada tasa de uso de agua. Se estima que por kg de biomasa seca, en condiciones ideales en invernadero consume 6,86 L día⁻¹ de agua. Debido a que la biomasa en su pico de crecimiento a las 12 semana es de 30,7 t ha⁻¹, una hectárea de vetiveria utilizaría potencialmente 279 kl de agua ha⁻¹ día (Danh *et al.*, 2009).

Tabla 6. Concentraciones de metales pesados acumulados en las raíces y brotes de vetiveria

Metales pesados	Suelo	Brotes	Raíces	Brotes/Raíces	Brotes/Total
	(mg kg ⁻¹)			(%)	
Arsénico (As)	620	11,2	268	4,2	4,0
Cadmio (Cd)	1,66	0,31	14,20	2,2	2,1
Cobre (Cu)	50	13	68	19	16
Cromo (Cr)	600	18	1750	1	1
Plomo (Pb)	730	78,2	87,8	87	47
Mercurio (Hg)	6,17	0,12	10,8	11	6
Níquel (Ni)	300	448	1040	43	30
Selenio (Se)	74,3	11,3	24,8	46	44
Cinc (Zn)	750	880	1030	85	46

Fuente: Truong (1999)

Características ecológicas. Vetiveria es una planta C4 que requiere mucho sol, es por tanto muy intolerante a la sombra que reduce su rendimiento y en casos extremos, puede llegar a eliminarla a largo plazo. Esta planta se caracteriza por una producción alta de biomasa (>100 t ha⁻¹ año⁻¹). Crece mejor en espacios abiertos y libres de malezas, siendo necesario el control de malas hierbas en la etapa de crecimiento (Truong *et al.*, 2009). Se considera una planta “nodriza” en tierras degradadas ya que reduce la erosión, estabiliza el terreno y consigue conservar la humedad y los nutrientes. Al mejorar el microambiente permite que otras especies cultivadas o espontáneas puedan establecerse (Truong *et al.*, 2009). En condiciones de helada su parte aérea muere o entra en latencia y se torna de color púrpura pero sus puntos de crecimiento subterráneos sobreviven.

El crecimiento óptimo de raíces se presenta a temperaturas del suelo de 25°C, pero continúan creciendo hasta los 13°C. Se estima que la latencia ocurre a 5°C (Truong *et al.*, 2009). Vetiveria puede establecerse en suelos de baja fertilidad sin necesidad de aplicar fertilizantes debido a su fuerte asociación simbiótica con una amplia gama de microbios del suelo que le proporcionan nutrientes (bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias y hongos solubilizadores de fosfatos, micorrizas y hongos celulolíticos) y fitohormonas (bacterias reguladoras del crecimiento de las plantas) para el desarrollo de la misma (Danh *et al.*, 2009).

En general, es muy resistente a enfermedades, sin embargo puede ser atacada por hongos del género *Fusarium* spp. y *Curvularia trifolia*. (Islam *et al.*, 2008). También, es resistente al fuego, heladas, tráfico y a la alta presión de pastoreo debido a su capacidad para formar nuevos brotes desde la corona subterránea. Vetiveria puede cultivarse en medios hostiles ya que posee la habilidad de rebrotar rápidamente tras superar las condiciones adversas del clima o tras añadir correctivos al suelo, pudiendo alcanzar una vida útil de hasta 50 años.

1.8.2. Verdolaga (*Atriplex portulacoides* L.)

Verdolaga, un arbusto enano C3, es una especie halófila, que prácticamente se limita a las marismas costeras, donde a menudo domina la vegetación. Verdolaga pertenece a la familia Chenopodioideae y es conocida de forma común como: salobreña, verdolaga marina, alsa verdolaga, sayón, cenizo blanco y armuelle berberisco (Figura 4). Sus sinonimias son las

siguientes: *Chenopodium portulacoides*, *Halimione portulacoides*, *Halimus australis*, *Halimus borealis*, *Halimus portulacoides* y *Obione portulacoides*.

Figura 4. Verdolaga (*Atriplex portulacoides* L.).

Verdolaga caracteriza a la mayoría de las marismas europeas. Las plantas utilizados para los ensayos de esta Tesis Doctoral fueron traídas de “El Encín” (IMIDRA), centro donde se realizan proyectos de investigación agroalimentaria y agroambiental de la Comunidad de Madrid, en el municipio de Alcalá de Henares, donde se sigue su crecimiento, desarrollo, fenología, adaptación y valor ornamental; además de su supervivencia. La especie ***Atriplex portulacoides*** se desarrolla mejor en suelos con pH ácido, neutro, alcalino o muy alcalino, pudiendo llegar a soportar terrenos salinos y pobres en nutrientes. Su parte subterránea crecerá con vigor en soportes con textura arenosa, franca o arcillosa, éstos se pueden mantener generalmente húmedos o empapados. Este arbusto es original de Europa a África del Norte y del Sur y Asia del Oeste puede llegar a alcanzar setenta y

cinco centímetros de altura. La verdolaga se vale de anemofilia para polinizar sus flores de color amarillo pálido dotadas de unidades reproductivas monoicas. Por último: esta especie posee hojas perennes. En cuanto a sus necesidades lumínicas, se puede asegurar que es medianamente exigente, puede situarse en un lugar con semi-sombra o con exposición directa al sol indistintamente. Con respecto a su dureza contra condiciones adversas podemos decir que aguanta perfectamente brisas marinas.

1.9. Sustancias húmicas

Para llevar a cabo la fitorremediación asistida se han utilizado diversos compuestos orgánicos solubles, capaces de mantener elevadas cantidades de metal en solución y transportarlo hacia la planta. La materia orgánica del suelo tradicionalmente se ha clasificado en dos grandes grupos: las sustancias no húmicas y las sustancias húmicas (Pence *et al.*, 2000) (Figura 5). Las sustancias no húmicas corresponden a aquellos compuestos orgánicos cuya estructura es conocida y perteneciente algún grupo de compuestos orgánicos definidos (por ejemplo carbohidratos, proteínas, lípidos y otras moléculas de mayor o menor tamaño).

Figura 5. Esquema de fracciones orgánicas en el suelo.

En general, actúan como fuente de carbono para multitud de microorganismos en el suelo por lo que su estructura cambiará en un periodo más o menos corto. Las sustancias húmicas, sin embargo, son el producto de la humificación, es decir, de la alteración de la materia orgánica del suelo por descomposición microbiana y por procesos abióticos. Suponen entre un 60 y un 80% de la materia orgánica del suelo. Deben considerarse como un material heterogéneo, constituido por un conjunto de sustancias altamente polimerizadas, de carácter ácido, peso molecular elevado, coloreadas de amarillo al negro, amorfas y con propiedades coloidales e hidrofílicas muy marcadas. Comprenden una mezcla heterogénea de macromoléculas que son relativamente resistentes a la degradación y ataque químico. Tienen estructuras alifáticas y aromáticas en sus moléculas, alta capacidad de cambio, gran densidad de grupos acídicos, carboxílicos y fenólicos, y están constituidas principalmente por C, H, O y N (Stevenson, 1982) (Figura 6).

Figura 6. Clasificación de los componentes de la materia orgánica del suelo.

Debido a la extraordinaria complejidad de los productos resultantes de los procesos de humificación, resulta imposible definir sus componentes elementales en términos químicos específicos. Por ello, para clasificar las sustancias húmicas, se recurre a formas operacionales indicadas en la Figura 7. El fraccionamiento se basa en la solubilidad e insolubilidad de los compuestos húmicos en soluciones acuosas a diferentes pH, lo que refleja diferencias en los pesos moleculares y contenido en grupos funcionales, principalmente oxigenados (Figura 8).

Ácidos fúlvicos (AF): fracción soluble en agua a cualquier valor de pH, constituidos por compuestos sólidos o semisólidos, amorfos, muy móviles, de carácter fuertemente ácido que les confiere capacidad de meteorización de minerales, color amarillento y naturaleza coloidal. Son susceptibles de experimentar floculación en determinadas condiciones de pH y concentración de soluciones de cationes no alcalinos.

Ácidos húmicos (AH): fracción soluble a pH alcalinos pero insoluble en medio ácido. Se presentan como sólidos amorfos y su color va del pardo oscuro al negro. Son macromoléculas de estructura compleja y ramificada, constituidas por un núcleo de naturaleza aromática más o menos condensada, y una región cortical con predominio de radicales alifáticos como péptidos, aminoazúcares, aminoácidos y otros constituyentes orgánicos (Tabla 7).

Figura 7. Fraccionamiento de las sustancias húmicas (I).

Figura 8. Fraccionamiento de las sustancias húmicas (II).

Tabla 7. Composición elemental de las Sustancias húmicas.

Elemento	Ácido húmico (%)	Ácido fúlvico (%)
C	53,8-58,7	40,7-50,6
O	32,8-38,3	39,7-49,8
H	3,2-6,2	3,8-7,0
N	0,8-4,3	0,9-3,3
S	0,1-1,5	0,1-3,6

Fuente: Sparks (2003).

Humina: fracción insoluble en agua a cualquier valor de pH; apenas tiene capacidad de reacción y su proporción en el suelo es escasa (alrededor del 20% de la materia orgánica del suelo).

Los principales grupos funcionales son de acuerdo con Sparks (2003): carboxílicos, fenólicos, quinónicos, alcohólicos, carbonílicos, aminas y amidas. Los AF presentan mayor carácter ácido al contener más grupos carboxílicos y fenólicos. Los ácidos húmicos se caracterizan por tener un elevado peso molecular, color amarillo de los AF al negro de los AH y una capacidad de intercambio catiónico, según el pH del orden de 150 a 300 $\text{cmol}_+ \text{kg}^{-1}$ (Tabla 8).

Tabla 8. Distribución de grupos funcionales en las sustancias húmicas.

Grupos funcionales	Ácidos húmicos	Ácidos fúlvicos
	(cmol ₊ kg ⁻¹)	
Acidez total	720±40	860±40
Carboxilos	310±20	400±20
OH Fenólico	420±30	460±20
OH Alcohólico	130±30	80±20
Carbonilo	130±10	430±10
Acidez total	720±40	860±40

Fuente: Sparks (2003).

1.9.1. Estructura de las Sustancias húmicas

Debido a la multitud de sustancias que se forman durante la humificación, las sustancias húmicas (**SH**) no presentan una única estructura. Schulten y Schnitzer (1993) propusieron una estructura aproximada en la que se aprecian los principales grupos funcionales y las partes aromáticas y alifáticas que determinan el comportamiento de las SH (Figura 9).

Figura 9. Estructura de un ácido húmico propuesta por Schulten y Schnitzer (1993).

Gran parte de los conceptos modernos sobre SH derivan de las teorías de Kononova (Kononova y Bel'chikova, 1961). Debido a la elevada heterogeneidad de las mezclas de ácidos húmicos los modelos se simplificaron. Las primeras teorías defendían la "teoría del polímero" que vislumbraba los ácidos húmicos como una mezcla de sustancias con elevado peso molecular y que exhibían un continuo en cualquier propiedad química. Con el avance y proliferación de las técnicas analíticas las teorías

evolucionaron hacia un nuevo concepto de “asociación supramolecular” en el cual varias moléculas relativamente pequeñas y químicamente diversas, forman un agregado (cluster) unido por uniones de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas (Balnois *et al.*, 1999; Buffle y Leppard, 1995).

Para demostrar que los *clusters* estaban formados por moléculas más pequeñas, se utilizó ácido acético (que ya se utilizaba como desnaturalizador de proteínas) y en otros casos HCl. Posteriormente, se utilizó la técnica de cromatografía de permeación en gel y cromatografía de exclusión por tamaño de alta presión (HPSEC) observándose que el tamaño aparente de fragmentos húmicos cambia drásticamente con la adición de ácidos orgánicos simples, en comparación con la adición de HCl como referencia. Estos cambios de tamaño se deben a la desagregación de los “*clusters*” en moléculas más pequeñas. Por el contrario, la baja hidrofobicidad y la alta carga negativa de los ácidos fúlvicos con respecto a los húmicos, no da lugar a la formación de clusters (Piccolo *et al.*, 2001).

1.9.2. Interacción de las sustancias húmicas con metales

Las sustancias húmicas juegan un papel determinante en el comportamiento y transporte de los iones metálicos en los suelos y aguas, ya sean iones tóxicos (Pb, As, Cd) o nutrientes (Ca, Na, Mg, etc.). La disponibilidad de estos iones se encuentra controlada por la presencia de dichas sustancias húmicas. Incluso a bajas concentraciones, las sustancias húmicas afectan significativamente la cantidad de metal libre y complejada en solución, por lo que resultan de suma importancia en el transporte de los

mismos (Jones y Bryan, 1998). El orden de afinidad decreciente de los grupos funcionales orgánicos por los iones metálicos es aproximadamente el siguiente (Stevenson, 1982):

Los complejos órgano-metálicos son el resultado de una reacción entre un anión complejante orgánico y un elemento metálico. Al compuesto que se combina con el ion metálico se le llama comúnmente ligando. Cuando dos o más grupos funcionales orgánicos de un mismo ligando se coordinan con un catión metálico en un complejo, se denomina quelato. Si el agente quelante forma dos enlaces con el ion metálico se dice que es bidentado. De la misma forma hay agentes quelantes tridentados, tetradentados y pentadentados. La formación de más de un enlace entre el metal y la molécula orgánica le proporciona mayor estabilidad al complejo (Stevenson, 1982). Si en un complejo el grupo central metálico y los ligandos están en contacto directo, el complejo se llama de esfera interna. Se trata de uniones fuertes al producirse enlaces de tipo iónico o covalente (Sposito, 1989). Si una o más moléculas de agua se interponen entre el grupo central y el ligando, el complejo se llama de esfera externa. La unión es de tipo electroestático, débil y permite un intercambio rápido del catión (Sposito, 1989). La capacidad total de unión de las sustancias húmicas con los iones metálicos es de 200-600 $\mu\text{mol g}^{-1}$ siendo las posiciones complejantes más importantes los grupos carboxilo y fenólico (Sparks, 2003).

1.9.3. Utilización de las sustancias húmicas

Las funciones que desarrollan las sustancias húmicas para la agricultura son de tipo físico, químico y biológico. Se analizan, a continuación y por separado, los efectos sobre el suelo y la planta. Algunos efectos sobre el suelo son:

i. Mejora de la estructura del suelo al facilitar la formación de agregados estables, se consigue una mayor porosidad favoreciéndose la aireación y el drenaje.

ii. Contribuye a una mayor retención de agua en el suelo y reduce la evapotranspiración. Este poder absorbente, junto con la agregación de las partículas, hace del humus un agente preventivo de la erosión de gran importancia.

iii. Facilita el calentamiento del suelo al proporcionarle un color oscuro que favorece la absorción de los rayos solares

iv. Modera las variaciones de temperaturas del suelo, debido a su débil calor específico se calienta o enfría rápidamente, de lo que resulta que está más frío que la arena en verano, y más caliente en invierno.

v. Aumento de la capacidad tampón o buffer. Evita los cambios bruscos de pH del suelo al poseer gran número de grupos funcionales hidroxilo y carboxilo que pueden sufrir procesos de disociación-asociación.

vi. Contribución a la capacidad de intercambio catiónico del suelo (CIC). Mejoran la fertilidad del suelo al retener elementos nutritivos en formas

fácilmente disponibles para las plantas, que además evitan las pérdidas por lavado (Stevenson y Fitch, 1994).

vii. Aporte de nutrientes a la planta (N, P, S) mediante su mineralización gradual y lenta por acción de microorganismos. Además, forman complejos naturales con los cationes aumentando la solubilidad de los metales y favoreciendo su toma por las plantas. Este es el caso del Fe procedente de hidróxidos insolubles, que se moviliza al formar complejos solubles con los sustancias húmicas (Oliver, 2009); y del fósforo mediante la formación de complejos fosfo-húmicos (el fósforo en el suelo es poco soluble y se fija a componentes minerales como óxidos de aluminio o arcillas, y forma fosfatos de calcio insolubles en suelos calizos).

viii. Evita la retención de los cationes del suelo desbloqueándolos. El humus es una fuente de gas carbónico. Su oxidación lenta libera dióxido de carbono que contribuye a solubilizar algunos elementos minerales del suelo facilitando así su absorción por la planta.

ix. Incremento de la población microbiana al servir de soporte para la actividad microbiana. Los microorganismos viven a expensas de las sustancias húmicas y contribuyen a su mayor transformación.

x. Combinación con xenobióticos¹ y metales contaminantes del suelo. Los radicales libres de las sustancias húmicas permiten la descomposición de determinados pesticidas afectando a su persistencia, bio-actividad, bio-

¹ Contaminantes de naturaleza química que producen efectos tóxicos o alteraciones en el normal funcionamiento de las células vivas. Entre los contaminantes más abundantes en el medio y perjudiciales para los sistemas biológicos destacan los metales pesados y las sustancias orgánicas (plaguicidas, hidrocarburos halogenados y no halogenados, PCBs, DBF y DBD, etc.)

degradabilidad y facilidad de lixiviación. La adsorción de pesticidas en las sustancias húmicas ocurre vía intercambiable y protonación, enlaces de H, fuerzas de Van der Waals, etc. (Sparks, 2003).

Las sustancias húmicas afectan la solubilidad y movilidad de contaminantes en aguas naturales y en suelos: éstas disminuyen si los contaminantes se unen a materia orgánica del suelo, pero aumentan si el enlace se realiza con materia orgánica disuelta. Algunos efectos de las sustancias húmicas sobre la planta son:

i. Estimula la germinación, para una dosis óptima según el origen de las sustancias húmicas y el producto comercial empleado. La germinación se inhibe con dosificaciones excesivas (Oliver, 2009).

ii. Acción rizogénica, favorecen la formación y desarrollo de las raíces principales y secundarias, permitiendo a las plantas explorar un mayor volumen de suelo.

iii. Acción estimulante que se traduce en una mayor absorción de nutrientes acompañada de una mejor utilización de los mismos por la planta, aumentando por ello el desarrollo y rendimiento vegetal.

iv. Mejora de la permeabilidad de la membrana plasmática radicular, permitiendo una alta absorción de nutrientes a través de ellas.

v. Metabolismo energético. Numerosos estudios muestran los efectos beneficiosos de las sustancias húmicas en los procesos metabólicos energéticos como la respiración y fotosíntesis. Esto se explica por un aumento en la concentración de clorofila y oxígeno absorbido por hojas y raíces, por una

mayor disponibilidad de Fe presente como quelatos y por la capacidad de las sustancias húmicas para actuar como donadores/aceptores de electrones en la cadena respiratoria (Ramos Ruiz, 2000).

vi. Actividad enzimática, síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Algunos autores han observado que las sustancias húmicas son capaces de producir cambios estructurales en el ADN, de influir en la síntesis de ARN mensajero y de intervenir en procesos bioquímicos que estimulan o inhiben la síntesis de proteínas y enzimas.

A pesar de los numerosos artículos que describen los efectos que producen las sustancias húmicas sobre el desarrollo de las plantas, aún no están claros los mecanismos de acción de las sustancias húmicas que implican un mayor crecimiento de las plantas (Oliver, 2009; Ramos Ruiz, 2000). Debido a los efectos beneficiosos de las sustancias húmicas en el suelo, el desarrollo vegetal y la microfauna, se comercializan un gran número de enmiendas orgánicas a base de sustancias húmicas. Los productos pueden ser sólidos o líquidos y aparecen en el mercado bajo la denominación de sustancias húmicas, ácidos húmicos o enmiendas húmicas, siendo sus orígenes diversos. En sólidos predominan aquellos productos procedentes de leonarditas², estiércoles de ovino combinados con diferentes residuos orgánicos (tortas de café, girasol, restos vegetales sin identificar, restos animales...) y turbas. Las sustancias húmicas comerciales líquidas proceden fundamentalmente de leonarditas, restos vegetales y turbas (Ramos Ruiz, 2000).

² Carbón lignito oxidado de color marrón presente en campos carboníferos con buen rendimiento de extracción de sustancias húmicas. En su estado natural es totalmente orgánico.

La **leonardita** es una forma oxidada de lignito encontrada exclusivamente en Dakota del Norte, llamada así en honor al primer científico en estudiar las propiedades de esta sustancia (Dr. A. G. Leonard). Su origen se remonta a la era carbonífera del Paleozoico, hace 280 millones de años, resultando de la deposición y carbonización de restos y fibras orgánicas en lagunas poco profundas, sometidas a condiciones particulares de presión y temperatura e inmersas en un conglomerado de acciones físicas, químicas y microbiológicas.

Existen diferencias estructurales entre las sustancias húmicas de origen natural y las de procedencia comercial, fundamentalmente debidas a los procesos de extracción. Sin embargo son muy similares en cuanto a composición, mecanismos de formación y parámetros analíticos, por lo que se espera que ejerzan la mismas acciones agrobiológicas positivas que las sustancias húmicas naturales (Oliver, 2009). La fracción extraíble de los materiales humificados comprende un abanico que va desde los ácidos fúlvicos a los ácidos húmicos. Cuando la materia prima del producto comercial sea un material joven y poco humificado, se obtendrán preferentemente fracciones fúlvicas con predominio de estructuras alifáticas, altamente hidrofílicas y muy activas en cuanto a su interacción con los micronutrientes y su movilidad, además su tiempo de residencia en el suelo es muy corto debido a su rápida biodegradación por microorganismos; por el contrario, cuando la materia prima sea un material carbonizado serán las fracciones húmicas con estructuras aromáticas muy policondensadas y de elevado peso molecular, las que predominen.

1.9.4. Sustancias húmicas comerciales

Las sustancias húmicas comerciales procedentes de lignitos son, por lo general demasiado inertes (Ramos Ruiz, 2000). Las mismas son procedentes de formas fósiles, contribuyen de forma escasa, a la estabilización de los agregados del suelo. Esto es debido a que las sustancias húmicas procedente de carbones, por ser un estadio avanzado en la transformación del humus a formas fósiles, han sufrido pérdidas de carbohidratos, proteínas y otros compuestos bioquímicos responsables de la mejora estructural de los suelos (Franco y Bañón, 1991).

1.9.5. Estabilidad de los complejos órgano-metálicos.

La estabilidad de los complejos órgano-metálicos da información acerca de la afinidad del metal por el ligando orgánico, y también del destino de los metales pesados en el medio ambiente. La estabilidad depende de la naturaleza, contenido y calidad de las sustancias húmicas, carga del metal, fuerza iónica de la solución, temperatura y pH (Jones y Bryan 1998). Entre las principales características de los metales que influyen en su adsorción en las superficies del suelo se encuentran el radio y el potencial iónicos. Para una valencia dada (z) el potencial iónico (z/r) decrece con el aumento del radio iónico (r). En el caso de los metales alcalinos y alcalinotérreos, los cationes con mayor radio iónico, al crear un menor campo eléctrico, presentarán una menor tendencia a permanecer solvatados en la interfase solido-solución, por lo que se adsorberán de forma preferente. Sin embargo, en los metales de transición se ha observado que su configuración electrónica ejerce una mayor influencia en la complejación superficial, formando complejos de estabilidad creciente al

aumentar el número de electrones *d* de su última capa y al disminuir su radio iónico (McBride, 1989). Los cationes más electronegativos tienden a formar enlaces covalentes con los átomos de oxígeno de las superficies de adsorción. La secuencia de selectividad de algunos metales en base a su electronegatividad es (McBride, 1994): $\text{Cu} > \text{Ni} > \text{Co} > \text{Pb} > \text{Cd} > \text{Zn} > \text{Mg} > \text{Sr}$. Cuando intervienen atracciones electrostáticas, la adsorción está influida por el potencial iónico, por lo que la secuencia seguiría el siguiente orden (McBride, 1994): $\text{Ni} > \text{Mg} > \text{Cu} > \text{Co} > \text{Zn} > \text{Cd} > \text{Sr} > \text{Pb}$. La afinidad de los metales por las superficies de adsorción se puede explicar mediante el principio del ácido-base duro-blando de Lewis (ABDB) según la clasificación de Pearson. El término duro significa una elevada electronegatividad, una baja polarizabilidad y un radio iónico pequeño, mientras que el término blando indica lo contrario. Entre los ácidos duros de Lewis se incluyen los siguientes cationes: Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Be^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ti^{4+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{3+} . Como ácidos blandos de Lewis están: Cu^+ , Ag^+ , As^+ , Cd^{2+} , Hg^+ , Hg^{2+} , Tl^+ , Pd^{2+} , Pt^{2+} . Hay otros metales con características intermedias, que no se ajustan bien a las dos categorías anteriores, que son: Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Sb^{3+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} .

Los ácidos duros de Lewis reaccionan o forman complejos preferentemente con las bases duras de Lewis. Las moléculas de agua actúan como bases muy duras, los minerales de arcilla como bases blandas y los óxidos de Fe como bases duras. Así, las arcillas muestran una preferencia por el Cd^{2+} en comparación con el Zn^{2+} o el Ni^{2+} , que son ácidos más duros y por tanto serán preferentemente adsorbidos por los óxidos de Fe (Alloway, 1995). Entre los grupos funcionales orgánicos, el sulfhidrilo (grupo tiol) se considera

una base blanda, mientras que los grupos carboxilo, alcohol, fenol y amino son bases duras. Por ello, los metales como Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} tienen preferencia por los grupos sulfhidrilo. Sin embargo, los ácidos fuertes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} compiten con éxito frente a los metales pesados por la formación de complejos con los abundantes grupos carboxilo presentes en el suelo (Sposito, 1984). Las constantes de estabilidad de los complejos órgano metálicos son ligeramente mayores a pH 5.0 que a pH 3.5, debido a la mayor disociación de los grupos funcionales a pH 5.0, y porque a pH inferior los iones metálicos compiten con los H^+ por los lugares de enlace del ligando (Sparks, 2003).

Solubilidad. Las sustancias húmicas forman complejos solubles e insolubles con cationes metálicos, y por ello juegan un doble papel fundamental en los suelos: resultan importantes en procesos de transporte y disponibilidad para las plantas, así como de inmovilización de metales tóxicos en los suelos. Los complejos metálicos de los ácidos fúlvicos son más solubles que los de los ácidos húmicos, debido a su mayor acidez y sus menores pesos moleculares, funcionando como transportadores de los metales hacia las raíces de las plantas. En contraste, los ácidos húmicos funcionan como un sumidero para los cationes polivalentes al formar complejos y quedar los metales retenidos sobre las superficies orgánicas del suelo, limitando así su movilidad (Stevenson, 1982). La forma más conocida de agregación de los ácidos húmicos debida a interacción con cationes, es la floculación a pH bajo (<2), lo que se utiliza para el fraccionamiento de sustancias húmicas. Se puede interpretar como una competición entre los grupos hidrófilos que tienden a solubilizar la molécula

(principalmente grupos con carga negativa) y los grupos hidrófobos. A pH alto, los grupos reactivos están suficientemente disociados como para que la molécula húmica tenga principalmente una carga negativa y se mantenga en solución. Sin embargo, a pH bajo los grupos reactivos no están disociados y la parte hidrofóbica tiene un papel importante, adquiriendo una conformación que produce la agregación de moléculas húmicas y su floculación (Tipping, 2002).

Las **sustancias húmicas** (SH) también se pueden insolubilizar en presencia de iones metálicos. Según Ong y Bisque (1968) el enlace entre cationes metálicos y sustancias húmicas reduce la repulsión culómbica intramolecular, lo que causa la compresión de la estructura húmica, la expulsión de agua y la creación de un coloide hidrofóbico. La coagulación es mayor a mayor carga del catión y a mayor concentración. Es un proceso similar a la floculación de coloides inorgánicos en los que la floculación es máxima en el punto de carga cero. La agregación también puede darse en la superficie de minerales en los que los cationes metálicos adsorbidos actúan de puente entre partículas minerales y sustancias orgánicas (Majzik y Tombácz 2007).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Con esta investigación se pretende abordar varios aspectos: la posibilidad de recuperar suelos mineros contaminados con elevadas concentraciones de metales pesados mediante la utilización de las especies *Chrysopogon zizanioides* y *Atriplex portulacoides*, y evaluar la eficiencia de fitorremediación de estas especies utilizando agentes quelantes, como sustancias húmicas (SH) comerciales proveniente de la leonardita.

2.1. Objetivo general

El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad fitoextractora de metales pesados y el comportamiento de dos especies vegetales: **vetiveria**, (***Chrysopogon zizanioides***) y **verdolaga marina** (***Atriplex portulacoides***) en suelos contaminados producto de la minería, adicionando diferentes dosis de sustancias húmicas.

2.2. Objetivos específicos

Determinar las concentraciones de metales pesados, principalmente: Cobre (Cu), Cadmio (Cd), Cinc (Zn), y Plomo (Pb) en suelos mineros provenientes de los municipios La Unión (Murcia), El Cuadrón, Garganta de los Montes y Bustarviejo (Madrid).

Evaluar el efecto de sustancias húmicas (SH) exógenas, provenientes de la leonardita, tanto en su estado líquido como sólido, en la movilización de metales pesados en suelos contaminados y en la biodisponibilidad potencial de dichos metales.

Evaluar el potencial de las plantas vetiveria y verdolaga para su utilización en técnicas de fitorremediación (fitoextracción o fitoestabilización) de suelos mineros contaminados con metales pesados.

Determinar el efecto de la aplicación de diferentes dosis de sustancias húmicas en el desarrollo vegetativo y capacidad de acumulación de metales de vetiveria y de verdolaga.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Origen de las muestras de suelo estudiadas: Localización, descripción y climatología

Este estudio se inició en el año 2012 seleccionando suelos procedentes de tres zonas mineras, pertenecientes a la Comunidad de Madrid: i) Bustarviejo, ii) El Cuadrón, iii) Garganta de los montes, ambas pertenecientes a la Sierra Norte de Madrid y vi) un suelo procedente de la zona minera La Unión, situada en la Comunidad de Murcia (Figura 10). A continuación se hace una breve descripción de las zonas de estudio.

Figura 10. Zonas de estudio.

Mina **Bustarviejo**: llamada también, La Mina de la Plata (Figura 11) se encuentra ubicada en la Comarca del Lozoya, en la Sierra Norte de la Comunidad de Madrid, asentada en las faldas de la Sierra de Guadarrama en su vertiente meridional (vertiente madrileña de la sierra de Guadarrama) con una altitud por encima de los 1200 metros sobre el nivel del mar (msnm).

Figura 11. Zona minera de Bustarviejo.

Esta mina está constituida por una serie de pozos y escombreras con altas cantidades de arsénico y metales pesados. La mina se empezó a explotar en el siglo XVII hasta 1890 y ha sido la explotación metálica que más tiempo estuvo activa en la provincia de Madrid. Durante 400 años se explotó una zona de brechificación ligada a una gran falla de dirección predominante N-0 27-E que atraviesa la zona conocida como Cuesta de la Plata, y donde se encuentra la mina de arsénico con alto contenido en plata, debido a la presencia de arsenopiritas con matildita. La mineralogía de la zona está constituida por As-Fe-Cu-Pb-Ag-Zn y Sn que aparece en bolsadas y pequeños filones de cuarzo en afloramiento, también se aprecia presencia de óxidos (Jordá y Jordá, 2005).

La mina “La Chilena”, situada en la localidad de **El Cuadrón** perteneciente al término municipal de Garganta de los Montes. Esta mina se trabajó de manera artesanal e intermitente entre 1847 y 1862. En 1852 es conocida como Mina Aurora y en 1857 se vuelve a registrar con el nombre de Esperanza también en la Sierra Norte en la Comunidad de Madrid, y situada en el valle del Lozoya (Figura 12).

Figura 12. Zona minera de El Cuadrón

Se encuentra a una altura de 1125 msnm. Fue explotada durante el siglo XIX hasta el año 1862 en el que se abandonó esta mina. Actualmente se encuentran los restos de una escombrera de 1,5 m de potencia y 15 m² de superficie y aún se conservan los pozos, con el agua a ras del suelo. De ella se extrajeron principalmente cobre y blenda cadmífera, este último mineral es recogido con especial interés por los autores quienes resaltan su composición: Zn, Fe, Cu y S además de un 0,18% de cadmio y 0,30% de bismuto, algo que no habían encontrado en ningún otro mineral en España. Otros minerales encontrados en la escombrera son: cuarzo, calcopirita, galena, crisocola, malaquita, azurita, bismutina, bismutita y bismuto nativo (Jordá, 2008). Se ha localizado en la escombrera, calcopirita y más raramente galena. También son apreciables granos de crisocola y malaquita pulverulenta y se llegó a explotar también un filón con una cantidad extraordinaria de bismutinita (Jiménez *et al.*, 2004).

La mina de cobre llamada “Fernandito” se encuentra situada a 2 km al sudeste del municipio de **Garganta de los Montes** (Figura 13). Algunos

minerales que fueron objeto de explotación en esta mina durante el siglo XIX y XX hasta que fue abandonada definitivamente en 1965 fueron: calcopirita, calcosina-bornita y malaquita (Jiménez *et al.*, 2004).

Figura 13. Zona minera Garganta de Los Montes.

Aún se puede distinguir en esta explotación una escombrera blanca de estériles de flotación, con una superficie de 3.500 m². Los suelos de esta zona están ubicados en cotas de 1.180 a 1.200 m y se clasifican como cambisoles húmicos y dístricos según la FAO (Encabo *et al.*, 1997). Entre la vegetación existente en esta explotación se encuentran principalmente formaciones de *Quercus pyrenaica* y *Fraxinus angustifolia*, así como varias especies de pasto que sirven de alimento al ganado y a la fauna silvestre (Pastor *et al.*, 2007). La cobertura vegetal alrededor de la escombrera es bastante escasa.

La zona minera de **La Unión** está situada en el complejo minero Cabezo Rajao, en Cartagena-La Unión, que es una formación montañosa situada en el borde meridional de la Región de Murcia, constituyendo el extremo suroriental de las cordilleras Béticas (Figura 14).

Figura 14. Zona minera de La Unión.

Se extiende a lo largo de 25 km de oeste a este, desde la ciudad de Cartagena hasta el Cabo de Palos, con una superficie aproximada de 100 km². Su explotación minera se inicia en el siglo III a.C. para la extracción de plomo, plata, cinc y hierro por los romanos, quienes explotaron la mina hasta el siglo III d.C., coincidiendo con la primera decadencia de la minería de la Sierra. La extracción se mantuvo de forma muy limitada en la época árabe, exclusivamente para cubrir las necesidades locales de metal. Durante la Edad Media y el Renacimiento la explotación, aunque fue pequeña, se mantuvo constante. En el siglo XIX la actividad minera resurgió con fuerza debido a la gran demanda de plomo ocasionada por el despegue industrial. A partir de 1950 y hasta el cese definitivo de la minería en 1990, se llevó a cabo una explotación extensiva a cielo abierto.

En cuanto a la climatología de las zonas de estudio en la que se encuentran las explotaciones mineras de Bustarviejo, Garganta de los Montes y de El Cuadrón, se tomaron los datos procedentes de la estación de Rascafría “El Paular”, y para la zona minera de La Unión los datos se obtuvieron de la estación de Cartagena La Victoria, las estaciones más próximas a las zonas de

estudio. El clima de la zona de la Sierra Norte de Madrid se considera mediterráneo continental (Lázaro *et al.*, 2013), de temperatura media anual de 10 °C pero con fuerte variación de temperaturas entre el invierno (con temperatura media mínima de -1 °C) y el verano (temperatura media máxima de 28,5 °C), una precipitación media anual de 1000 mm con un periodo seco en verano, una evapotranspiración potencial (ETP) de 625 mm anuales, concentrándose en verano la mitad de la ETP anual. La zona de La Unión se clasifica como mediterráneo semiárido, con temperatura media anual de 18 °C, una EPT anual de 900 mm y una precipitación anual de 275 mm, principalmente durante la primavera y el otoño y distribuida en unas pocas precipitaciones intensas (Martínez-Martínez *et al.*, 2013).

3.2. Recolección y manejo de muestras de suelo

Para la toma de muestras se eligieron los sitios más representativos de cada uno de los emplazamientos mineros, (Bustarviejo, El Cuadrón, Garganta de los Montes y La Unión) (Figura 15, Figura 16, Figura 17 y Figura 18). Las muestras de suelos se obtuvieron de los primeros 20 cm superficiales, tomadas de distintos puntos de cada zona alrededor de las escombreras de las minas. Los muestreos de estos suelos fueron realizados en el año 2012.

Figura 15. Localización del punto de muestreo en la Mina de la Plata de Bustarviejo. Fuente: visor cartográfico del Instituto Geográfico Nacional, disponible en: www2.ign.es.

Figura 16. Lugar donde se tomaron las muestras del suelo de El Cuadrón (40° 56' 36,08" N).

Figura 17. Área donde se tomaron las muestras de suelo en la mina “Fernandito” situada en Garganta de los Montes.

Figura 18. Localización del punto de muestreo (37°37'0,78" N; 0°53'52,42" O; 134 m) en las proximidades de Mina Iberia situada en el complejo minero de Cabezo Rajao en La Unión (Región de Murcia).

Los suelos muestreados se trasladaron al laboratorio. En primer lugar se procedió a homogeneizar y secar al aire parte de las muestras. Se tamizaron a < 2 mm para separar tierra fina de elementos gruesos para los posteriores análisis. Una parte del suelo se trasladó a los campos de prácticas de la ETSI Agrónomos (Universidad Politécnica de Madrid) para su establecimiento en los ensayos de cultivo en invernadero. Otra parte de las muestras de suelo secas y tamizadas se molieron para la determinación de algunas propiedades en un molino de bolas de zirconio RETSCH durante 2 minutos.

3.3. Propiedades de las sustancias húmicas comerciales utilizadas:

Se trata de sustancias de color muy oscuro, con elevado pH y elevado contenido en extracto húmico total, siendo los ácido húmicos el componente principal. Las características principales de las sustancias húmicas utilizadas para este trabajo se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Propiedades de las sustancias húmicas comerciales.

Propiedad	Humitec® Extra Dry	Humitec®
Aspecto	sólido granulado fino	líquido
Color	negro	negro
Densidad (g cm ⁻³)	0,62	1,14
pH (1%)	11,1	13,4
Solubilidad g L ⁻¹	100	-
Extracto Húmico Total (EHT) (% p/p)	65,0	15
Ácidos Húmicos (AH) (% p/p)	53,0	12
Ácidos Fúlvicos (AF) (% p/p)	12,0	3
Carbono Orgánico (% sms)	38,55	43,5
Óxido de potasio K ₂ O %	17	5

3.4. Análisis físico y químico de los suelos

En las muestras de suelos mineros se determinó contenido de humedad, textura, pH, conductividad eléctrica (CE), materia orgánica total (MOT), carbono orgánico fácilmente oxidable (COX) y la concentración total de metales pesados, principalmente cobre (Cu), cadmio (Cd), plomo (Pb) y cinc (Zn). La concentración de metales pesados en los diferentes extractos se midió mediante espectrometría de absorción atómica (PERKIN ELMER AAnalyst 400). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Se emplearon disoluciones madre de 1000 mg L⁻¹ de J.T. BAKER Atomic Absorption Standard y MERCK CertiPUR Standard Solution para la preparación de los patrones. Las

disoluciones y los patrones se prepararon con agua ultrapura obtenida en el equipo BARNSTEAD EasyPure RoDi (D13321).

3.4.1. Contenido de humedad

La determinación de la humedad se realizó pesando 10 g de suelo previamente tamizado y pesado en una balanza analítica con una precisión de $\pm 0,01$ g. Las muestras de suelo se secaron en capsulas de aluminio utilizando 3 cápsulas por suelo, éstas se secaron en estufa a 105 °C durante 24 horas, después de ese tiempo se pusieron a enfriar en un desecador. Una vez alcanzada la temperatura ambiente se procedió a pesarlas y se calculó la humedad por diferencia de peso entre la muestra húmeda y seca.

3.4.2. Textura

La textura se determinó mediante el método de Bouyoucos (Day, 1965; M.A.P.A., 1994). Se pesaron 50 g de suelo seco al aire y tamizado a 2 mm en un vaso de 250 mL y se añadieron 100 mL de una solución dispersante de 50 g L⁻¹ de (NaPO₃)₆ (hexametafosfato sódico), y se dejó reposar una noche. Después, se enrasó hasta 200 mL con agua destilada y se agitó durante 15 minutos. Se decantó el contenido del vaso en una probeta de 1 L, se separó la fracción de arena gruesa en un tamiz de 0,2 mm de malla. La arena retenida, se metió en una cápsula de aluminio y se secó en estufa a 105 °C durante 24 horas para la determinación del peso seco. El contenido de la probeta se enrasó con agua hasta 1 L. La suspensión se agitó con una varilla y se tomaron lecturas subsecuentes de temperatura y densidad utilizando un densímetro ASTM 152H a los 0,5; 1; 3; 10; 30; 90; 360; 480; 540 y 1440 minutos. De forma

análoga se tomaron las mismas lecturas en un blanco con 100 mL de la solución dispersante llevada a 1 L con agua. Se calculó el porcentaje en peso de partículas en suspensión (P) y su diámetro equivalente (D) mediante:

$$P(\%) = \frac{(L_n - L_0)}{b} \times 100$$

$$D(\mu m) = \frac{\theta}{\sqrt{t}} \times \sqrt{\frac{\eta_{x^\circ C}}{\eta_{30^\circ C}}}$$

Ecuación 1

Donde L_n y L_0 corresponden a las lecturas del densímetro en la suspensión en las muestras y en el blanco respectivamente, b es el peso de suelo seco a 105 °C, θ es parámetro de sedimentación tabulado en función de la lectura del densímetro en la suspensión, t es el tiempo y el último término de la ecuación del diámetro es un factor de corrección de la viscosidad tabulado en función de la temperatura (Day, 1965). Se determinó la clase textural de los suelos mediante los porcentajes de las fracciones arena, limo y arcilla según el sistema USDA con la ayuda de un esquema del triángulo textural.

3.4.3. Determinación de pH

Se realizaron dos medidas de pH, una para la determinación de la acidez actual en agua destilada y otra para la acidez potencial en una sal neutra no hidrolizable, concretamente en KCl 0,1 M. La acidez actual se midió por triplicado en extractos suelo/agua en proporción 1:2,5 (p/v). Mientras que la acidez potencial se midió en extracto de suelo/solución de KCl 0,1 M en proporción 1:2,5 (p/v). Cada extracto se preparó pesando 10 g de tierra fina con una precisión de $\pm 0,01$ g en un envase, y añadiendo 25 mL de agua destilada o KCl. Se cerró bien el envase con la suspensión, se agitó durante media hora

a intervalos de 5 minutos. A continuación se midió el pH de las tres suspensiones (Figura 19).

3.4.4. Conductividad eléctrica

La medida de la conductividad eléctrica (CE) se realizó con un conductímetro sobre el extracto de suelo/agua en proporción 1:2,5 de las tres muestras de suelos utilizadas anteriormente para la medición del pH en agua (Figura 19).

Figura 19. pH-metro y conductímetro.

3.4.5. Materia orgánica total

La determinación de la Materia Orgánica Total (MOT) se realizó mediante el método de pérdida de peso por ignición de Nelson y Sommers (1996). Se pesaron en crisoles de cerámica 3 g de suelo seco a 105 °C y molido y las muestras se calcinaron durante 16 h en una mufla a 400 °C, gradualmente se aumentó la temperatura en tramos de 2 h aumentando 200 °C en cada uno. El contenido de MOT se calculó por diferencia entre el peso seco inicial y el peso calcinado en la mufla. El porcentaje de Carbono Orgánico Total (COT) se calculó mediante el factor de conversión de Van Bemmelen ($COT = MOT / 1,724$).

3.4.6. Carbono orgánico fácilmente oxidable

La determinación del contenido en Carbono Orgánico Oxidable (COX) del suelo se llevó a cabo mediante una modificación del método de oxidación por vía húmeda de Walkley-Black, descrita por Nelson y Sommers (1996). Este método consiste en una oxidación del carbono orgánico del suelo mediante un exceso de dicromato potásico en presencia de ácido sulfúrico y un calentamiento espontáneo por adición de ácido sulfúrico, valorando el exceso de dicromato por retroceso con $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (sal de Möhr). Se pesaron 0,5 gramos de muestra seca y molida en un erlenmeyer de 250 mL, se añadieron 10 mL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1 N en la muestra y se mezcló durante 30 segundos lentamente. A continuación se añadieron 20 mL de H_2SO_4 concentrado, removiendo lentamente y dejándolo reposar durante 30 minutos. La muestra se diluyó con 150 mL de agua destilada y una vez enfriada se añadieron 10 gotas de ortofenantrolina. La valoración se realizó con sal de Möhr 0,5 N anotando el volumen gastado (V_M) cuando se produjo el viraje de color verde a pardo-rojizo. Este mismo procedimiento se llevó a cabo en un blanco (sin muestra de suelo) registrando también el volumen gastado de sal de Möhr (V_B). El porcentaje de carbono orgánico fácilmente oxidable (COX) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$COX = \frac{3,9}{P_M} \times \left(1 - \frac{V_M}{V_B} \right)$$

Ecuación 2

Donde P_M es el peso de muestra de suelo seco a 105 °C (g).

3.4.7. Determinación de la Capacidad de Intercambio Catiónico

Para la determinación de la capacidad de intercambio catiónico (CIC) se utilizó el método para suelos ácidos de Rhoades (1982).

Este método consta de tres pasos que son (i) una saturación de los lugares de intercambio del suelo con Ba^{2+} , a continuación (ii) el suelo se equilibra con una solución de Ba^{2+} para finalmente (iii) desplazar el Ba^{2+} con Mg^{2+} . La pérdida de Mg de la solución reactiva se determina mediante el análisis de la concentración de Mg en la solución de equilibrio final y es equivalente a la cantidad adsorbida, y por lo tanto a la CIC. De ese modo, por cada 100 g de suelo y con **x, y, z** expresados en miliequivalentes:

$$\mathbf{CIC} = \text{meq de Mg que desaparecen de la solución} = \mathbf{z} [\mathbf{y} + (\mathbf{z-x-y})] = \mathbf{x} \text{ meq/100 g} = \mathbf{x} \text{ cmol}_+/kg$$

Se realizaron tres repeticiones de la determinación de la CIC en tubos de centrífuga prepesados de 50 mL. En cada uno de ellos se pesaron 2 g de suelo seco al aire y se adicionaron 20 mL de BaCl_2 0,1 M. Para conseguir la saturación del suelo con Ba^{2+} se agitaron los tubos de centrífuga durante 2 horas y se centrifugaron a 5000 rpm durante 6 minutos. Finalmente se decantaron y se desechó la solución sobrenadante.

El suelo se equilibró mediante la adición de tres alícuotas sucesivas de 20 mL de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,002 M. Con cada alícuota de solución equilibrante, los tubos de centrífuga se sometieron a ultrasonidos 10 segundos para dispersar la muestra, se agitaron durante 1 hora y se centrifugaron a 5000 rpm durante 6 minutos para decantar los sobrenadantes y desecharlos. Tras la última decantación del sobrenadante, se pesaron los tubos de centrifuga conteniendo

el suelo y la solución atrapada de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,002 M. De esta manera, se puede conocer el volumen de solución atrapada por diferencia de pesos entre el actual, el del suelo y el del tubo de centrifuga.

Para intercambiar el Ba con el Mg se añadieron 10 mL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 M a los tubos de centrifuga y se agitaron durante 1 hora. Previo al ajuste de la conductividad eléctrica (CE) como indica el método, para impedir la pérdida de partículas de suelo que puedan quedar adheridas al electrodo, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm. El método de Rhoades (1982) indica la adición de gotas de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 M, o bien de agua destilada para ajustar la CE de la suspensión reactiva a la del de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0015 M. Sin embargo, debido a los valores tan elevados de la CE de los sobrenadantes (que en las muestras de La Unión superaban los 2,2 dS m^{-1} en contraste con los 0,332 dS m^{-1} del $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0015 M) las muestras de suelo de La Unión fueron diluidas con 5 mL de agua destilada, se agitaron durante 15 minutos para homogeneizarlas y se centrifugaron de nuevo 5 minutos a 5000 rpm. Una nueva medida de la CE de los sobrenadantes continuó dando valores elevados, próximos a los 2,2 dS m^{-1} , se asumió por tanto que es debido a la presencia de yeso y se continuó con el método. Se agitaron los tubos de centrifuga durante toda la noche y se pesaron para conocer el volumen añadido, aunque en este caso no es necesario pues ya se conoce. El volumen de la solución sobrenadante final (V_3) contenido en cada tubo de centrifuga fue calculado mediante la suma del volumen de solución atrapada en el paso de equilibrio, más los 10 mL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 M adicionados en el paso de intercambio más el volumen de gotas añadido para ajustar la CE en las muestras, que en este caso son 5 mL de agua destilada.

Finalmente, los tubos de centrifuga se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos y se decantaron los sobrenadantes conservándolos para el análisis de la concentración de magnesio (C_1) con el aparato de absorción atómica. El cálculo de la CIC es el siguiente:

$$CIC \left(\frac{meq}{100 g} \right) = CIC \left(\frac{cmol+}{kg} \right) = \left(\frac{100}{P_{suelo seco}} \right) \times (0.1 - (C_1 \cdot V_3))$$

3.4.8. Fraccionamiento de metales

El fraccionamiento de los metales en las muestras de suelo se realizó siguiendo el procedimiento de extracción secuencial de Tessier *et al.* (1979), descrito en Ma y Rao (1997), modificando la extracción de la fracción residual, que se realizó por digestión con agua regia. Este procedimiento separa los metales en seis fracciones distintas. Para llevar a cabo la extracción secuencial se pesó 1 g de suelo seco al aire en un bote de centrifuga de 40 mL al que se añadieron diferentes extractantes, obteniendo las siguientes fracciones:

- 1) Soluble en agua: se añadieron 15 mL de agua ultrapura y se agitó durante 2 h.
- 2) Intercambiable: al residuo procedente de la extracción anterior se le añadieron 8 mL de $MgCl_2$ 1 M a pH 7 y se agitó durante 1 h.
- 3) Soluble en ácido débil (carbonatos): al residuo procedente de la extracción anterior se le añadieron 8 mL de NaOAc 1 M a pH 5 y se agitó durante 5 h.
- 4) Unida a óxidos de Fe y Mn (reducible): al residuo procedente de la extracción anterior se le añadieron 20 mL de $NH_2OH \cdot HCl$ 0,04 M en 25% (v/v) ácido acético y agitando intermitentemente durante 6 h calentando a 96 °C.

- 5) Unida a la materia orgánica y sulfuros: al residuo procedente de la extracción anterior se le añadieron 3 mL de HNO_3 0,02 M y 5 mL de H_2O_2 al 30% ajustados a pH 2 con HNO_3 con agitación ocasional durante 2 h a 85 °C. Se añadió una segunda alícuota de 3 mL de H_2O_2 al 30% a pH 2 y se agitó intermitentemente durante 3 h a 85 °C. Tras enfriar la mezcla se añadieron 5 mL de NH_4OAc 3,2 M en 20% (v/v) HNO_3 , se diluyó a 20 mL con agua ultrapura y se agitó de forma continua durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 6) Residual: el residuo procedente de la extracción anterior fue trasvasado a un vaso de teflón y digerido con agua regia en microondas de la misma forma que se describe en el apartado 3.4.10.

Después de cada extracción, se centrifugaron las muestras durante 30 minutos a 9.000 rpm y el sobrenadante se filtró y recogió para medir los metales en absorción atómica. Previamente a cada extracción los residuos fueron lavados añadiendo 8 mL de agua ultrapura, agitando fuertemente y centrifugando 30 minutos a 9.000 rpm para desechar el sobrenadante.

3.4.9. Extracción de metales por el método Rhizo

Además de las determinaciones anteriores, para evaluar la biodisponibilidad de metales, se llevó a cabo una extracción según el método Rhizo (Feng *et al.*, 2005a, 2005b). Este procedimiento consiste en extraer los metales del suelo mediante una mezcla de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, los cuales suelen encontrarse en los exudados de las raíces. Este método simula las condiciones de la rizosfera teniendo en cuenta la interacción suelo-raíz y se han obtenido mejores resultados que con otros procedimientos

utilizados para predecir la absorción de metal por diferentes cultivos. Para ello se pesaron 2 g de suelo seco y molido se le añadieron 20 mL de una mezcla de ácido acético, láctico, cítrico, málico y fórmico, con una relación molar de 4:2:1:1:1 (c/c), siendo la concentración total de 0,01 M. La mezcla se agitó durante 16 h, se centrifugó durante 10 minutos y se filtró, midiendo los metales en el extracto.

3.4.10. Concentración total de metales pesados en los suelos

La determinación de la concentración total de metales se llevó a cabo mediante una digestión con agua regia en horno microondas siguiendo la norma ISO 11466 (1995). Para ello, 1 g de muestra de suelo seca a 105 °C y molida se pesó en un vaso de teflón y se añadieron 7 mL de HCl al 37% y 2,35 mL de HNO₃ al 65%. Se agitaron suavemente durante 5 minutos para que los ácidos reaccionaran, se cerró el vaso y se introdujo en un horno microondas BERGHOF Speedwave Four a 190 °C durante 35 minutos. Después, los vasos se enfriaron durante 10-15 minutos en un baño de agua a temperatura ambiente. Tras la digestión se filtró el contenido del vaso y se llevó a 50 mL con agua ultrapura. En este extracto se midió la concentración total de metales pesados en absorción atómica.

3.5. Extracción de metales pesados: capacidad de las sustancias húmicas para movilizar metales pesados

Para determinar la capacidad extractora de las sustancias húmicas (SH) se llevó a cabo una curva de desorción secuencial utilizando soluciones de sustancias húmicas comerciales como extractantes siguiendo el esquema de la Figura 20. Se realizó un tratamiento testigo con agua destilada. En primer lugar

se pesaron 10 ($\pm 0,01$) g de suelo tamizado, se añadieron 20 mL de la solución extractante correspondiente (Figura 20). Las muestras se introdujeron en un baño de ultrasonidos durante 1 minuto para dispersar la muestra y a continuación se agitaron durante 4 horas y luego se dejaron en reposo durante dos días. Pasado éste tiempo se centrifugaron las muestras a 8000 rpm durante 10 minutos y se decantó el sobrenadante en un frasco de polietileno. Este proceso se repitió 4 veces sobre el mismo suelo.

La determinación de los metales pesados en las distintas extracciones se llevó a cabo por absorción atómica, utilizando como soluciones de fondo las mismas disoluciones de sustancias húmicas. Para la preparación de las soluciones extractantes, se utilizaron sustancias húmicas sólidas (SH_s) y sustancias húmicas líquidas (SH_L) de la marca Humitec® (Tabla 10).

Las dosis recomendadas por el fabricante para el tratamiento como enmienda corresponden a 60–80 L ha⁻¹. En este caso se eligieron dosis mucho mayores para forzar la extracción de metales. En un principio se comenzaron los ensayos utilizando las sustancias húmicas sólida y la líquida. Dado que los resultados fueron muy similares, se continuó sólo con la formulación líquida.

Figura 20. Procedimiento para extraer metales pesados con sustancias húmicas comerciales.

Tabla 10. Sustancias húmicas en solución extractante.

Tratamiento	SH en solución extractante	Dosis en tubo	Dosis en campo	EHT	pH
	g SH L ⁻¹ solución	mg SH/10 g suelo	kg ha ⁻¹	%	
SH sólida	0,25	5	97,5	1,6	7,9
	1	20	390	6,5	8,2
	5	100	1950	32,6	9,7
	mL L ⁻¹ solución	μL SH/10 g suelo	L ha ⁻¹	%	pH
SH líquida	2,5	25	125	1,8	8,1
	5	100	500	7,5	8,6
	25	500	2500	37,5	9,7

3.6. Ensayos de cultivo en invernadero

3.6.1. Establecimiento e Instalación

Los ensayos se instalaron en uno de los invernaderos de los campos de práctica de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid (coordenadas: 40° 31' 33" N y 3° 17' 22" W, a una altitud de 610 msnm). La fase experimental se inició en junio de 2012 y

finalizó en junio de 2013. El ensayo se llevó a cabo bajo condiciones controladas de temperatura (12 – 24°C).

3.6.2. Diseño experimental y manejo de los ensayos

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA) con cuatro tratamientos (dosis de SH sólidas) y diez repeticiones por tratamiento. Los ensayos contaron con 40 unidades experimentales por suelo, utilizando dos suelos mineros por especie. En los suelos de El Cuadrón y La Unión se plantó vetiveria en Junio del año 2012 y el ensayo con verdolaga en los suelos Bustarviejo y El Cuadrón se plantó en Octubre del mismo año. Los tratamientos utilizados fueron: 0 (testigo, T), 2, 10 y 20 g de sustancias húmicas (SH) comerciales por kg de suelo, aplicadas como producto sólido. La simbología utilizada para la identificación de las macetas fue la siguiente: en primer lugar se hace referencia al suelo (C: El Cuadrón; U: La Unión, B: Bustarviejo), a continuación se indica la dosis de sustancias húmicas aplicadas (T, 2, 10 y 20 g) con el subíndice se numeran las repeticiones (Figura 21).

Figura 21. Simbologías utilizadas en los ensayos.

Estas dosis fueron elegidas según los resultados obtenidos en experimentos previos en los que se evaluó la capacidad de estas sustancias húmicas para movilizar metales pesados en suelos mineros. Se añadieron 1,4 kg de las muestras de suelos mineros en macetas de polietileno con dimensiones de 16 cm de altura y 14,5 cm de diámetro de profundidad inferior, mezclado con 100 gramos de perlita y en el fondo de la maceta se colocaron 300g de grava con el fin de obtener un mejor drenaje y oxigenación. También se adicionó fertilizante de liberación lenta Osmocote Plus® (15-9-12) para 12-14 meses en dosis de 3 g kg⁻¹ de suelo. Antes de la siembra, las plantas fueron sumergidas durante una hora en 15 litros de agua con 15 mL de fungicida para su desinfección como prevención de enfermedades. Los esquejes de vetiveria se plantaron con 20 cm de altura y con raíz de 5 cm mientras que la verdolaga fueron plántulas ya enraizadas. La plantación se regaba cada dos días con 100 mL de agua durante el verano y en invierno se regó con 80 mL cada cinco días. En la época más crítica del cultivo se instaló riego por goteo y el mismo fue ajustado de acuerdo a los requerimientos de las plantas.

3.6.3. Muestreo de las especies vegetales

Durante la permanencia del ensayo se realizaron tres muestreos con la especie vetiveria, los cuales se describen a continuación. i) En Octubre del 2012, a los 120 días después de la plantación de vetiveria se realizó un primer corte de la misma en la parte aérea. ii) En Febrero de 2013 (240 días), se realizó el segundo corte únicamente en el suelo de El Cuadrón debido a que en el suelo de La Unión las plantas no sobrevivieron después de un primer corte, iii) En junio de 2013 (365 días) se realizó el tercer y último corte en la vetiveria

plantada en el suelo de El Cuadrón, los cortes se realizaron al ras del suelo. En la especie verdolaga se realizó un primer y único corte (Abril 2013, 180 días) en la parte aérea, realizándolo a ras del suelo. Al final del cultivo las macetas se llevaron al laboratorio y se separaron las raíces de los suelos utilizando un tamiz de 2 mm. Todas las evaluaciones de las muestras vegetales (aérea y radicular) se pesaron (peso fresco), se lavaron con agua para arrastrar partículas de suelo que pudieran estar adheridas, se llevaron a la estufa para su secado a $68\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas. Una vez finalizado este período de tiempo se enfriaron y se pesaron (peso seco). Las muestras se molieron de forma preliminar utilizando un molino de café y se volvieron a moler utilizando un molino de bolas hasta obtener una muestra fina para una mayor homogenización.

3.6.4. Determinaciones analíticas en el tejido vegetal

Para determinar el contenido en metales en las plantas se llevó a cabo una digestión ácida del material vegetal, según el método 3050B de la US Environmental Protection Agency (1996). Para ello se colocaron 0,4 g de muestra de parte aérea o raíz seca y molida en vasos de teflón, y en los casos en los que no se disponía de tal cantidad, se utilizó toda la muestra vegetal disponible. Se añadieron también 5 mL de HNO_3 65% y 3 mL de H_2O_2 (30%) en los vasos de teflón y se llevaron al horno microondas a $190\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 25 minutos. Una vez enfriados se filtraron a través de papel de filtro cuantitativo Whatman nº 42 y se llevó hasta 50 mL con agua ultrapura. En el extracto obtenido se determinó el contenido total en metales pesados (Cu y Zn) en parte aérea y raíz por espectrometría de absorción.

3.7. Análisis de suelo (Post cultivo)

Las muestras de suelo de las macetas tras el cultivo se llevaron al laboratorio para medir pH y determinar la concentración de metales mediante el método Rhizo.

3.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS v. 17.0. Las medias fueron comparadas mediante ANOVA con el test de Tukey, con un nivel de significancia $P < 0,05$. Para comparar medias entre dos tratamientos, las diferencias significativas se calcularon mediante una prueba t de Student ($P < 0,05$). El error estándar de las medias se calculó para determinar la variabilidad de los datos. Para analizar las correlaciones entre las distintas variables obtenidas se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson (r) mediante una prueba de significación bilateral.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Características de los suelos

En este apartado se presentan los resultados correspondientes a las propiedades químicas de los suelos estudiados. En la Tabla 11 se muestran materia orgánica total (MOT), el carbono orgánico oxidable (COX), pH, capacidad de intercambio catiónico (CIC), conductividad eléctrica (CE) y metales pesados totales en los suelos Garganta de los Montes, El Cuadrón, La Unión y Bustarviejo.

Tabla 11. Propiedades químicas de los suelos y metales totales

Propiedad	Unidad	Garganta	El Cuadrón	La Unión	Bustarviejo
MOT	%	1,50	2,39	0,56	0,74
COX	%	1,29	1,93	0,23	0,20
pH (1:2,5 _{agua})		6,2	5,4	4,6	4,0
pH (1:2,5 _{KCl})		5,2	4,6	4,4	3,3
CIC	cmol ₊ kg ⁻¹	4,75	4,79	1,39	1,33
CE(1:2,5 _{agua})	dS m ⁻¹	0,10	0,05	2,65	0,07
Cu _T	mg kg ⁻¹	913	248	424	1084
Zn _T	mg kg ⁻¹	203	146	6536	6617
Cd _T	mg kg ⁻¹	3,7	1,3	10,5	18,9
Pb _T	mg kg ⁻¹	87	75	12317	2315
As _T	mg kg ⁻¹	-	26	329	4891

MOT = materia orgánica total, COX = carbono orgánico oxidable, pH, CIC = capacidad de intercambio catiónico, CE = conductividad eléctrica, Cu_T = cobre total, Zn_T = Zinc total, Cd_T = Cadmio total, Pb_T = Plomo total, As_T = Arsénico total.

En relación a la materia orgánica total (MOT), los suelos de Garganta y El Cuadrón cuentan con mayor contenido, mientras que La Unión y Bustarviejo, tienen un porcentaje muy bajo. Esto se debe posiblemente a que la actividad minera en los suelos de Garganta y El Cuadrón se abandonó mucho antes, por lo que los suelos han sufrido una atenuación natural, dando lugar a vegetación espontánea. En la Tabla 11 se aprecia que los valores de CE en el caso de El

Cuadrón, Garganta y Bustarviejo son muy inferiores a los de La Unión. Este valor indica que en el suelo La Unión (Murcia) hay una mayor presencia de sales solubles procedentes de la escombrera. En cuanto al pH en extracto acuoso se observa que es de carácter ácido. Los valores obtenidos en KCl siempre son menores al obtenido en extracto acuoso en mayor o menor medidas. Cuando la diferencia entre uno y otro es alta, como es el caso de El Cuadrón y Garganta nos indica que el complejo de cambio contiene cationes ácidos (Al^{+3}) que se intercambian con el K^{+} de la solución del suelo y al llegar a la solución se hidrolizan liberando protones.

4.1.1. Textura de los suelos

La textura se encuentra relacionada con la movilidad de los metales en el suelo (Tabla 12), siendo mayor en suelos arenosos que en suelos arcillosos.

Tabla 12. Textura de los suelos

Unidad	Garganta	El Cuadrón	La Unión	Bustarviejo
%Arena	78,2	79,4	73,9	82,4
%Limo	18,8	17,3	15,3	15,1
%Arcilla	3,1	3,3	10,8	2,5
Clase textural	Arena Franca	Arena Franca	Franco Arenosa	Arena Franca
%Elementos gruesos	27,8	31,3	17,3	25,4

Esto se debe a que en los suelos arenosos los metales pesados no retenidos y pueden contaminar con mayor facilidad las aguas subterráneas; en cambio en los suelos arcillosos los metales pesados están adsorbidos en las posiciones de intercambio de las arcillas lo que dificulta que los metales pesados alcancen el nivel freático.

4.2. Fraccionamiento de metales en los suelos estudiados

En un primer momento se llevó a cabo un fraccionamiento de los metales pesados en el suelo para determinar su movilidad y disponibilidad para las plantas, asumiendo, que las primeras fracciones son las más lábiles y por tanto las más disponibles (Tabla 13, Tabla 14, Tabla 15 y Tabla 16).

Tabla 13. Fraccionamiento de metales (método Tessier *et al.*, 1979) en el suelo de La Unión (los números entre paréntesis corresponden a la desviación típica de las repeticiones).

Fracciones	Concentración de metales pesados (mg kg ⁻¹ de suelo)							
	Cd		Cu		Pb		Zn	
Soluble Agua	1,8	(±0,2)	2,0	(±0,6)	23	(±8,8)	483	(±42,2)
Intercambiable	1,1	(±0,1)	1,0	(±0,3)	381	(±76,2)	249	(±17,2)
Sol. ácido débil	0,7	(±0,2)	10,9	(±0,9)	719	(±249,0)	356	(±73,2)
Áds. óx. Fe Mn	0,7	(±0,2)	66,3	(±10,9)	31	(±7,6)	1978	(±142,0)
Orgánico y sulf	1,6	(±0,4)	70,2	(±1,7)	401	(±1,2)	839	(±196,9)
Residual	4,3	(±1,1)	248,8	(±27,9)	8988	(±936,9)	3000	(±318,2)
Σ Fracciones	10,1		399,2		10542		6905	
Digestión Total	10,5	(±1,9)	424,2	(±40,8)	12317	(±987,3)	6617	(±561,0)
No residual (%)	57,8		37,7		14,7		56,6	
Residual (%)	42,2		62,3		85,3		43,4	

El suelo de La Unión tiene una contaminación importante debido al plomo, aunque éste se encuentra fundamentalmente en la fracción residual y por lo tanto no será móvil. Sin embargo hay cantidades importantes en la fracción soluble en ácido débil que en condiciones ácidas podría movilizarse. El Zn también se encuentra en cantidades apreciables y sólo un 40% se encuentra en la fracción residual. En cuanto al Cu no se encuentra en cantidades elevadas lo mismo que el Cd.

Tabla 14. Fraccionamiento de metales (método Tessier *et al.*, 1979) en el suelo de El Cuadrón (los números entre paréntesis corresponden a la desviación típica de las repeticiones).

Fracciones	Concentración de metales pesados (mg kg ⁻¹ de suelo)							
	Cd		Cu		Pb		Zn	
Soluble Agua	nd		2,8	(±0,3)	3,9	(±0,3)	1,4	(±0,1)
Intercambiable	0,2	(±0,1)	12,7	(±0,8)	0,3	(±0,6)	25,9	(±1,8)
Sol. ácido débil	nd		34,5	(±2,3)	4,0	(±0,3)	5,8	(±0,4)
Áds. óx. Fe-Mn	0,2	(±0,1)	68,9	(±1,8)	20,3	(±1,4)	29,1	(±0,9)
Orgánico y sulf	0,2	(±0,0)	50,6	(±5,8)	8,7	(±1,3)	8,1	(±0,3)
Residual	0,2	(±0,3)	70,6	(±3,9)	28,3	(±3,4)	56,6	(±4,1)
Σ Fracciones	0,9		240,1		65,6		126,9	
Digestión Total	1,3	(±0,3)	247,8	(±5,1)	74,7	(±1,0)	145,8	(±2,1)
No residual (%)	77,8		70,6		56,8		55,4	
Residual (%)	22,2		29,4		43,2		44,6	

En el suelo de El Cuadrón, cuya actividad minera fue abandonada hace más de 150 años, los niveles de metales han descendido debido a la atenuación natural. También se aprecia que las fracciones recalcitrantes han disminuido a favor de las más lábiles. El Cu, al igual que el Cd se encuentra distribuido en todas las fracciones siendo la fracción residual minoritaria. En el caso del Zn y Pb, la fracción residual ha disminuido en gran medida y han aumentado las más lábiles aunque en menor medida que en el caso del Cu.

La actividad minera en la mina de Bustarviejo prácticamente cesó a finales del siglo XIX, aunque hubo intentos de reactivarla en 1977 lo que ha dejado vestigios mineros que contrastan con la antigua minería y una escombrera reciente. En la Tabla 15 es de destacar que la concentración de

metales es elevada y que además se encuentran fundamentalmente en la fracción residual. Un elemento que abunda en esta escombrera, al que no se le ha hecho un seguimiento en este estudio es el arsénico. Este elemento no es un metal pesado, es un metaloide, funciona como anión y sería interesante tenerlo en cuenta en estudios futuros.

Tabla 15. Fraccionamiento de metales (método Tessier *et al.*, 1979) en el suelo de Bustarviejo (los números entre paréntesis corresponden a la desviación típica de las repeticiones).

Fracciones	Concentración de metales pesados (mg kg ⁻¹ de suelo)							
	Cd		Cu		Pb		Zn	
Soluble Agua	nd		1,1	(±0,2)	3,7	(±0,0)	2,00	(±0,1)
Intercambiable	0,6	(±0,0)	10,3	(±0,8)	9,5	(±0,0)	6,0	(±0,5)
Sol. ácido débil	0,6	(±0,0)	4,8	(±0,5)	4,7	(±0,0)	2,0	(±0,3)
Áds. óx. Fe Mn	0,8	(±0,1)	43,0	(±3,4)	15,3	(±2,0)	50,9	(±6,7)
Orgánico y sulf	1,1	(±0,4)	35,5	(±6,9)	28,4	(±3,2)	55,3	(±18,0)
Residual	31,3	(±1,0)	1684	(±48)	2605	(±143)	9156	(±355)
Σ Fracciones	34,4		1779		2667		9272	
No residual (%)	9,0		5,3		2,3	97,7	1,3	
Residual (%)	91,0		94,7		97,7	2,3	98,7	

En cuanto al suelo de Garganta de los Montes la situación es parecida a la de El Cuadrón. En cuanto a la disminución de las fracciones más recalcitrantes, aunque la cantidad de Cu total es muy superior.

Tabla 16. Fraccionamiento de metales (método Tessier *et al.*, 1979) en el suelo de Garganta de los Montes (los números entre paréntesis corresponden a la desviación típica de las repeticiones).

Fracciones	Concentración de metales pesados (mg kg ⁻¹ de suelo)							
	Cd		Cu		Pb		Zn	
Soluble Agua	nd		1,5	(±0,2)	3,1	(±0,6)	0,4	(±0,8)
Intercambiable	1,0	(±0,0)	21,3	(±0,9)	nd		5,5	(±0,3)
Sol. ácido débil	0,2	(±0,0)	88,7	(±4,9)	3,6	(±0,4)	3,8	(±0,2)
Áds. óx. Fe Mn	1,1	(±0,4)	442,7	(±35,6)	31,8	(±1,2)	47,7	(±1,6)
Orgánico y sulf	0,2	(±0,0)	223,4	(±40,2)	5,2	(±0,4)	10,1	(±0,6)
Residual	0,5	(±0,0)	152,2	(±27,9)	30,3	(±0,0)	131,4	(±1,5)
Σ Fracciones	3,0		929,8		74,0		198,9	
Digestión Total	3,7	(±0,7)	913,5	(±24,3)	87,1	(±1,7)	207,8	(±5,0)
No residual (%)	82,8		16,7		41,0		66,1	
Residual (%)	17,2		83,3		59,0		33,9	

4.3. Capacidad de extracción de metales por sustancias húmicas comerciales

Dado que se utilizaron sustancias húmicas comerciales como enmienda en la fitoextracción asistida, previamente se realizaron una serie de extracciones secuenciales utilizando soluciones concentradas de dichas sustancias húmicas para ver su capacidad de extracción. En principio se utilizaron tanto soluciones preparadas a partir del compuesto comercial sólido como del líquido. Debido a que son extractantes de carácter básico, se determinó el pH de todos los extractos. El objetivo que se pretendía era relacionar la cantidad de metales extraídos con estas soluciones de SH con la cantidad de metales retenidos inicialmente en las distintas fracciones del suelo.

4.3.1. Extracción de metales en el suelo de La Unión

Lo primero que se observa en los extractos llevados a cabo con el suelo de La Unión es que los sobrenadantes son de color transparente a pesar de añadir una solución muy oscura que contiene las sustancias húmicas. Esto *a priori* parece indicar que hay una floculación de las SH, posiblemente debido al elevado contenido de metales en el suelo o una precipitación de las SH sobre los sólidos del suelo sobre los que se encuentran adsorbidos los metales pesados. En cuanto a la concentración de metales extraídos por las distintas soluciones podemos decir que el agua destilada (testigo) fue capaz de desorber una mayor cantidad de Cu que las soluciones de sustancias húmicas. De hecho en este suelo, los extractos desde el primer momento aparecieron transparentes, es decir sin sustancias húmicas solubles.

Como se puede observar esto ocurre tanto en la formulación sólida como en la líquida. Sabiendo que este suelo tiene una elevada concentración de metales, se cree que ha tenido lugar una agregación/floculación de los ácidos húmicos con los metales, tanto en la superficie de los sólidos como con los elementos solubles. En la Figura 23 se observa que cuanto mayor era la dosis de sustancias húmicas menor era la disponibilidad de cobre. De todas formas el cobre no era un elemento preocupante en el suelo de La Unión ya que otros elementos se encuentran en cantidades muy superiores.

Figura 22. Leyenda de los gráficos de extracción de metales con diferentes dosis de sustancias húmicas

Figura 23. Extracción de cobre en el suelo de La Unión, con soluciones de distintas dosis de sustancias húmicas. Las líneas verticales representan el error típico de la media

En cuanto a la extracción de cinc, se observa que las dosis más bajas tienen un comportamiento similar al agua destilada (testigo). Sin embargo la dosis más elevada ya comienza a inmovilizar el cinc. El cinc tiene una menor capacidad de formar complejos y quelatos que el cobre con las sustancias húmicas lo que se aprecia en estas gráficas. Prácticamente no existe diferencia entre usar la formulación sólida o la líquida.

Figura 24. Extracción de cinc en el suelo de La Unión, con soluciones de distintas dosis de sustancias húmicas. Las líneas verticales representan el error típico de la media.

En cuanto a la desorción de Cd la situación es muy similar a la encontrada en el caso del cinc. Las menores dosis de sustancias húmicas se comportan prácticamente como el agua destilada y sin embargo con la dosis más alta de SH se aprecia cierta inmovilización.

Figura 25. Extracción de cadmio en el suelo de La Unión, con soluciones de distintas dosis de sustancias húmicas. Las líneas verticales representan el error típico de la media.

La Figura 26 nos muestra la coloración de los extractos del suelo de La Unión; en la fila superior las tres repeticiones de las 4 extracciones secuenciales realizadas con la dosis de $2,5 \text{ mL L}^{-1}$ de SH, preparadas a partir de la forma líquido. La 2ª fila muestra el tratamiento de 5 mL L^{-1} , y la 3ª fila la de 25 mL L^{-1} . Como se puede observar, a pesar de añadir 4 dosis consecutivas de una solución de sustancias húmicas (color negro), estas desaparecen de la solución. Sólo después de las 4 extracciones consecutivas con la dosis más elevada, empieza a aparecer cierta coloración. Esto mismo se aprecia en el ensayo con macetas, en las que los lixiviados fueron transparentes. Las sustancias húmicas se encuentran totalmente asociadas a los sólidos del suelo y no sufren ningún movimiento ni por lixiviación ni por capilaridad. Es de destacar que a pesar de estar añadiendo unas soluciones extractantes relativamente básicas, el pH del extracto se mantiene cerca de la neutralidad. Sin duda, la formación de complejos de esfera interna, que liberan un protón por cada enlace SH-Metal formado contribuye a este hecho. Se puede por tanto concluir que la adición de sustancias húmicas en el suelo de La Unión (Tabla 17) no moviliza los metales presentes. Al contrario, inmoviliza los metales lo que podría impedir la fitoextracción pero de alguna forma los metales quedarían inmovilizados en el suelo.

Figura 26. Coloración de los extractos realizados con soluciones de SH_L del suelo de La Unión

Tabla 17. Extracción acumulada de metales en el suelo de La Unión con SH_L (mg kg⁻¹)

Dosis SH (g L ⁻¹)	Cu	Zn	Cd	Pb	pH final
0	0,8	721,8	2,8a	11,8	6,2
0,25 (pH 7,9)	0,4	707,0	2,5b	9,7	6,7
1 (pH 8,2)	0,2	561,8	2,4b	3,5	6,9
5 (pH 9,7)	nd	129,4	0,6a	1,5	7,6

4.3.2. Extracción de metales en el suelo de El Cuadrón

Al observar los datos de este suelo (Figura 27) se aprecia en primer lugar que no hay diferencia entre los 2 gráficos de los extractos con las sustancias húmicas sólida y líquida sugiriendo que las dos formulaciones tienen el mismo comportamiento. Al contrario que en el suelo de La Unión, sí se aprecia una movilización de metales al añadir sustancias húmicas. Cuanto mayor es la dosis, mayor es la cantidad de cobre extraída (Figura 27). La dosis más alta, moviliza 30 mg de Cu kg⁻¹ en la primera extracción y disminuye progresivamente. Las dosis inferiores, van extrayendo pequeñas cantidades de cobre en cada extracción, pero esta cantidad se mantiene prácticamente constante a lo largo del proceso.

Figura 27. Extracción de cobre en el suelo de El Cuadrón, con soluciones de distintas dosis de sustancias húmicas. Las líneas verticales representan el error típico de la media.

La situación es parecida en el caso del cinc (Figura 28). La dosis más baja se comporta de forma parecida al agua destilada. La siguiente dosis extrae una mayor cantidad, y se sigue extrayendo después de 4 extracciones, y por último la dosis más elevada tiene una mayor capacidad de extracción aunque al final del ensayo estaba extrayendo lo mismo que la siguiente dosis.

Figura 28. Extracción de cinc en el suelo de El Cuadrón, con soluciones de distintas dosis de sustancias húmicas. Las líneas verticales representan el error típico de la media.

La cantidad de cadmio (Figura 29), extraída es muy baja y cercana al límite de detección. Aun así se puede ver que la dosis alta de sustancias húmicas es capaz de extraer una mayor cantidad de metal que las dosis bajas y el testigo.

Figura 29. Extracción de cadmio en el suelo de El Cuadrón, con soluciones de distintas dosis de sustancias húmicas. Las líneas verticales representan el error típico de la media.

Figura 30. Coloración de los extractos realizados con soluciones de SH_L del suelo de El Cuadrón.

En la Figura 30 se observa que, el contrario de lo que ocurría en el suelo de La Unión, las sustancias húmicas se mantienen en solución, por lo que pueden movilizar metales del suelo. En esta zona la actividad minera se

abandonó hace más de 100 años lo que se refleja en los bajos niveles de contaminación. Aun así observamos que las dosis más altas de sustancias húmicas (Tabla 18) movilizan cantidades más altas de metales, lo que los hace más disponibles para las plantas que se utilicen en fitorremediación. Cuando se realizó el ensayo en invernadero se observó que las macetas con suelo de El Cuadrón lixiviaban agua coloreada de sustancias húmicas, algo que no se observó en el suelo de La Unión.

Tabla 18. Extracción acumulada de metales en el suelo de El Cuadrón con SH_L (mg kg⁻¹)

Dosis SH (g L ⁻¹)	Cu	Zn	Cd	Pb	pH final
0	0,7	0,3	0,1	nd	6,4
0,25 (pH 7,9)	12,2	0,4	nd	0,4	7,0
1 (pH 8,2)	39,5	0,6	0,4	0,1	7,2
5 (pH 9,7)	91,4	0,4	0,8	0,3	8,4

Esos valores más altos de pH que se obtienen pueden provocar una mayor adsorción de los metales en las superficies del suelo.

4.3.3. Extracción de metales en el suelo de Garganta

Como se aprecia en los gráficos ambos tipos de sustancias húmicas tienen un comportamiento muy similar. Se observa un incremento en la movilización de Cu al incrementar la dosis. La cantidad extraída después de 4 extracciones es superior a la suma del metal que inicialmente está ya sea en solución o de forma intercambiable (Figura 31), lo que indica que en este suelo estas sustancias húmicas movilizan fracciones menos disponibles.

Figura 31. Extracción de cobre en el suelo de Garganta, con soluciones de distintas dosis de sustancias húmicas. Las líneas verticales representan el error típico de la media.

Con respecto a la movilización de Zn por las sustancias húmicas en el suelo de Garganta llama la atención los bajos niveles movilizados (Figura 32). El cinc tiene menor afinidad que el Cu y el Pb por los lugares de adsorción y por los grupos reactivos de las sustancias orgánicas debido a su inferior potencial iónico y electronegatividad. En este estudio, las disoluciones de sustancias húmicas ni siquiera son capaces de extraer la fracción que originalmente estaba soluble. Bien es cierto que según se van añadiendo las soluciones extractantes de sustancias húmicas, aumenta el pH y esto puede originar una mayor adsorción y/o precipitación lo que inmoviliza el Zn que inicialmente estaba en solución. Esta tendencia también fue observada por otros investigadores (Asworth y Alloway, 2008).

Figura 32. Extracción de cinc el suelo de Garganta, con soluciones de distintas dosis de sustancias húmicas. Las líneas verticales representan el error típico de la media.

En la Figura 33 se observa que en el caso del Cd, a pesar de encontrarse en concentraciones inferiores al Zn, su movilidad se ve afectada por las distintas concentraciones de sustancia húmica y es evidente que hay una respuesta mayor al incrementar la concentración de SH.

Figura 33. Extracción de cadmio en el suelo de El Cuadrón, con soluciones de distintas dosis de sustancias húmicas. Las líneas verticales representan el error típico de la media.

Figura 34. Coloración de los extractos realizados con soluciones de SH_L del suelo de Garganta

En la Tabla 19 en el suelo de Garganta de los Montes se aprecia un aumento de la movilización del Cu y Cd al aumentar la dosis de sustancia húmica, e igualmente se observa un aumento del pH. Por el contrario, la dosis más alta de SH (5 g L^{-1}) es igual de efectiva que la dosis 20 veces más baja. Además de una inmovilización debido a la formación de complejos el elevado pH puede provocar la adsorción de los metales en los sólidos, a pesar de que no se aprecia una disminución del color de las SH en los extractos.

Tabla 19. Extracción acumulada de metales en el suelo de Garganta con SH_L (mg kg^{-1})

Dosis SH (g L^{-1})	Cu	Zn	Cd	Pb	pH final
0	0,7	0,3	0,1	nd	6,4
0,25 (pH 7,9)	12,2	0,4	nd	0,4	7,0
1 (pH 8,2)	39,5	0,6	0,4	0,1	7,2
5 (pH 9,7)	91,4	0,4	0,8	0,3	8,4

De este estudio se evidencia que el Cu es el elemento que se moviliza mejor con las sustancias húmicas. Además cuando la concentración de

metales es elevada, las sustancias húmicas coagulan, inmovilizando los metales del suelo.

En el caso del Pb en todos suelos se obtuvieron resultados inesperados y dispersos. Las lecturas estuvieron cerca del nivel de detección, lo que hace que no se sepa con exactitud si son capaces de movilizarlo. Llama la atención los bajos niveles detectados al compararlos con los niveles tan altos observados en el fraccionamiento. Es evidente que existe una inmovilización de este metal por las sustancias húmicas pero dada la gran dispersión de los datos, creemos que hay interferencias en la medición debido a las sustancias húmicas.

4.4. Ensayo de cultivo con vetiveria

En este ensayo se pretendió evaluar el uso potencial de vetiveria (*Chrysopogon zizanioides*), especie herbácea perenne, de rápido crecimiento, alta producción de biomasa y con un sistema radicular de gran profundidad, para la recuperación de suelos expuestos a una elevada contaminación de metales pesados mediante técnicas de fitoextracción asistida utilizando sustancias húmicas comerciales provenientes de la leonardita. Para ello se cultivó esta especie en macetas con mezclas de suelos mineros contaminados (El Cuadrón, C; La Unión, U) y sustancias húmicas comerciales (SH), aplicado en diferentes dosis (0, 2, 10 y 20 g SH kg⁻¹ suelo), con objeto de estudiar su efecto sobre la disponibilidad de metales en el suelo y sobre el crecimiento de las plantas y su capacidad de absorción de metales.

4.4.1. Propiedades de los suelos después del cultivo de vetiveria

En la Tabla 20 se muestran las propiedades de los suelos después del cultivo se observan los valores de pH en los suelos mineros, así como la concentración de metales extraídos mediante el método Rhizo (mezcla de ácidos orgánicos de bajo peso molecular frecuentemente exudados por las plantas), determinados en las macetas al finalizar el ensayo de cultivo. Con ello se pretende comprobar el efecto de las sustancias húmicas sobre las condiciones del suelo y su disponibilidad de metales.

Tabla 20. Propiedades de los suelos después del cultivo de vetiveria

Tratamiento	pH	Cu Rhizo	Zn Rhizo
		(mg kg ⁻¹)	
CT	5,9 a ± 0,36	33,1 b ± 2,1	68 a ± 9
C2	5,6 a ± 0,40	36,4 b ± 3,4	85 a ± 7
C10	5,9 a ± 0,58	28,1 ab ± 3,0	63 a ± 10
C20	7,6 a ± 0,07	17,5 a ± 1,3	52 a ± 2
UT	5,1 a ± 0,05	5,6 b ± 0,8	1827 b ± 166
U2	5,2 a ± 0,03	4,6 b ± 0,9	1626 ab ± 92
U10	5,5 a ± 0,02	2,7 ab ± 0,4	1447 ab ± 87
U20	5,7 a ± 0,21	1,6 a ± 0,2	1290 a ± 26

Propiedades de las mezclas de suelo con diferentes dosis de sustancias húmicas tras el cultivo de vetiveria. Media ± Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; U = La Unión. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2, 10 y 20 g kg⁻¹.

La adición de una mayor dosis de SH produjo generalmente un aumento del pH en ambos suelos, debido al elevado pH que presenta este material orgánico (pH 11). Sin embargo, dichas variaciones no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos.

En cuanto a la concentración de Cu extraído del suelo mediante el método Rhizo, se observó una disminución significativa al añadir la dosis más elevada, de 20 g SH kg⁻¹ suelo, indicando con ello una reducción de la biodisponibilidad de este metal en el suelo. De igual manera que el Cu, la concentración de Zn también disminuyó al añadir dosis más elevadas de SH, siendo el tratamiento U20 el único que mostró diferencias significativas respecto al testigo. Halim *et al.* (2003) también observaron una disminución en la cantidad de metales (Cu, Zn, Pb, Cd y Ni) extraídos del suelo con ácido acético al añadir ácidos húmicos. Igualmente, Shuman (1999) reportó que los ácidos húmicos pueden reducir la disponibilidad de Zn en el suelo al ser redistribuidos a formas menos lábiles.

Esta menor disponibilidad de metales al añadir SH se debió posiblemente al aumento de pH, el cual incrementó la densidad de carga negativa de las partículas sólidas del suelo y favoreció procesos de precipitación, y a la aportación de materia orgánica, lo que aumentó las superficies de adsorción de metales, contribuyendo así a una mayor retención de los metales en la fase sólida del suelo. Se encontró una correlación negativa entre el Zn extraído con Rhizo y el pH del suelo ($r = -0,61$, $P < 0,01$). En cambio, el Cu no mostró tales correlaciones con el pH, ya que este metal no se ve tan influido por esta propiedad del suelo como el Zn, estando la disponibilidad de Cu más fuertemente afectada por otras variables, como la solubilidad de los compuestos orgánicos. Ashworth y Alloway (2008) también observaron que la solubilidad de algunos metales, como el Zn y Cd, está controlada

principalmente por el pH, mientras que el Cu, así como el Pb, se ven más influidos por la materia orgánica.

Al comparar ambos suelos, se observa un mayor contenido de Cu disponible en el suelo de El Cuadrón, mientras que el suelo de La Unión presenta una concentración de Zn considerablemente más elevada.

4.4.2. Crecimiento de las plantas de vetiveria

En la Figura 35 y Figura 36 se puede observar el crecimiento de las plantas en los tratamientos con SH en ambos suelos contaminados.

Las plantas cultivadas en macetas con suelo de La Unión presentaron producciones de biomasa aérea y radicular considerablemente más bajas que aquellas que fueron cultivadas en el suelo de El Cuadrón. Incluso, en los tratamientos con bajas dosis de SH en el suelo de La Unión (UT y U2) las plantas obtuvieron un desarrollo insignificante de su parte aérea, pereciendo todas ellas antes de realizar el primer corte, por lo que no pudieron incluirse dichos datos en este estudio. En los tratamientos U10 y U20 sólo se pudieron recoger muestras de la parte aérea durante el primer corte, y en U20 únicamente sobrevivieron las plantas de una maceta.

Figura 35. Peso seco de las raíces de vetiveria al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos. Media $\pm$ Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; U = La Unión. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2, 10 y 20 g kg⁻¹.

Figura 36. Peso seco total de la parte aérea (suma de los 3 cortes) de vetiveria al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos. Media $\pm$ Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; U = La Unión. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2, 10 y 20 g kg⁻¹.

Al comparar las diferencias entre tratamientos con diferentes dosis de SH, los dos suelos presentaron comportamientos bastante distintos. En el caso de la biomasa radicular, ésta fue mayor al aumentar la dosis de SH en el suelo de

El Cuadrón, mientras que no varió prácticamente en ninguno de los tratamientos del suelo de La Unión. En cuanto al peso de la parte aérea, en el suelo de El Cuadrón disminuyó ligeramente con la dosis de SH, mientras que en La Unión aumentó. En todo caso, ninguna de estas variaciones fue significativa debido a la elevada variabilidad de los datos obtenidos en las diferentes macetas. Este aumento de biomasa aérea con las SH en el caso de La Unión fue consistente con los resultados de Angin *et al.* (2008), que obtuvieron un mayor rendimiento de vetiveria al añadir mayor cantidad de SH en suelos con altas concentraciones de Pb (el cual se presenta en concentraciones muy elevadas en La Unión).

El escaso desarrollo de biomasa vegetal en el suelo de La Unión, especialmente en los tratamientos con baja dosis de SH, pudo deberse al elevado nivel de contaminación por metales, principalmente de Zn, As y Pb, con la consiguiente toxicidad sufrida por las plantas. De acuerdo con Andra *et al.* (2009) esta especie es muy tolerante a la exposición de altas concentraciones de Pb debido a su complejación con fitoquelatinas, por lo que el Zn o el As debieron de ser los causantes principales de la fitotoxicidad. Datta *et al.* (2011) demostraron que la vetiveria es capaz de tolerar niveles moderados de As en el suelo de hasta 225 mg kg⁻¹, concentración inferior al de este suelo. Así, la aportación de SH al suelo de La Unión mejoró el crecimiento de las plantas debido a la reducción de la biodisponibilidad de metales en el suelo, como pudo observarse en la Tabla 20. Se observaron correlaciones fuertes y negativas entre el peso seco de las raíces con la concentración de Zn en las raíces ($r = -0,79$, $P < 0,01$) y con la concentración de Zn en el suelo

($r = -0,86$, $P < 0,01$). También estuvo negativamente correlacionado el peso seco de la parte aérea con la concentración de Zn en el tejido aéreo ($r = -0,74$, $P < 0,01$) y con la concentración de Zn en el suelo ($r = -0,92$, $P < 0,01$). No se encontraron tales correlaciones negativas entre el Cu en el suelo y en los tejidos con la biomasa vegetal. Xu *et al.* (2009) observaron que las plantas de vetiveria habían reducido considerablemente su crecimiento debido a la toxicidad producida por elevados niveles de Zn, especialmente si estaban combinados con una alta concentración de Cd, la cual también fue elevada en el suelo de La Unión.

4.4.3. Concentración de metales en los tejidos vegetales de vetiveria

Se midió la concentración de Cu en las raíces de las plantas cultivadas en los diferentes tratamientos con SH de ambos suelos una vez finalizado el ensayo (Figura 37).

Figura 37. Concentración de Cu en las raíces de vetiveria al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos. Media $\pm$ Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; U = La Unión. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2, 10 y 20 g kg⁻¹.

Puede observarse que las raíces de las plantas cultivadas en el suelo de La Unión presentaron concentraciones de Cu algo inferiores a las de El Cuadrón, dado el menor contenido de Cu disponible extraído mediante el método *Rhizo* que poseen las muestras de La Unión.

A pesar de que la disponibilidad de Cu en los suelos determinada mediante el método *Rhizo* (Tabla 20) disminuyó al añadir una mayor dosis de SH, se observó un incremento en la concentración de este metal en la raíz con dosis más elevadas de SH en el suelo de El Cuadrón, siendo este aumento significativo en el caso del tratamiento C20. Aunque la concentración de Cu extraído con *Rhizo* fue menor en estos tratamientos de mayor SH, debido al mayor pH y contenido en materia orgánica, la aportación de compuestos orgánicos solubles, especialmente correspondientes a la fracción de ácidos fúlvicos (estas sustancias húmicas comerciales contienen un 12% de ácidos fúlvicos), favoreció la movilización del Cu mediante la formación de complejos órgano-metálicos solubles (Ashworth y Alloway, 2008; Schwab *et al.*, 2007). Esta movilización potenció así la absorción por la planta del Cu soluble de la solución del suelo (fracción más lábil que la representada por el metal extraído con *Rhizo*) y su acumulación en las raíces. Clemente y Bernal (2006) también encontraron que la aplicación de ácidos húmicos al suelo conseguía movilizar el Cu debido a su complejación con la materia orgánica soluble. A su vez, otro estudio (Evangelou *et al.*, 2004) mostró que la formación de quelatos entre fragmentos de ácidos húmicos y los metales puede favorecer su absorción por las plantas.

Por ello, la extracción realizada mediante el método Rhizo, en el que se utilizan ácidos orgánicos de bajo peso molecular, no reflejó de forma óptima la biodisponibilidad real de Cu en este caso concreto a pesar de las fuertes correlaciones con la concentración de metal en planta encontradas en otros trabajos (Feng *et al.*, 2005a, 2005b). Halim *et al.* (2003), a pesar de observar que disminuía la cantidad de metales extraídos con ácido acético al añadir dosis crecientes de sustancias húmicas, reportaron un incremento de metales extraídos con DTPA, lo que indica una mayor disponibilidad potencial para su absorción por las plantas.

Por el contrario, en el suelo de La Unión se apreció una ligera disminución en la concentración de Cu de las raíces en el tratamiento U20, aunque dicho cambio no fue significativo. En La Unión, donde la concentración de metales (Zn, Pb, Cu, Cd) en el suelo fue considerablemente superior, los metales pudieron haber actuado de puente de unión entre las sustancias húmicas aportadas, provocando así la aglomeración de complejos órganos-metálicos y, por tanto, una inmovilización del Cu y otros metales (Clemente y Bernal, 2006; El-Eswed y Khalili, 2006; Tipping, 2002), con la consiguiente reducción de su absorción por la planta. Esto también podría explicar el mejor rendimiento de las plantas en los tratamientos de mayor dosis de SH en La Unión por una menor toxicidad por metales. Además, este suelo presenta un pH más bajo que el de El Cuadrón (Tabla 20), condiciones en las que la materia orgánica es menos soluble al precipitar los ácidos húmicos aportados por las sustancias húmicas comerciales añadidas (Ashworth y Alloway, 2008; El-Eswed y Khalili, 2006; Tipping, 2002), la cual contiene un 53% de ácidos húmicos. Todo ello se

corroborar con el hecho de que los lixiviados producidos en las macetas de este suelo resultaron de color claro, indicando que las sustancias húmicas añadidas han sido retenidas en el suelo.

En la Figura 38 se muestran las concentraciones de Cu en los tejidos de la parte aérea de las plantas determinadas en los 3 cortes realizados durante el ensayo de cultivo, donde se puede observar que en la parte aérea de las muestras vegetales procedentes del suelo de El Cuadrón tuvo lugar una tendencia similar a la ocurrida en las raíces. Así, generalmente hubo un aumento en la concentración de Cu en la parte aérea conforme aumenta la dosis de SH añadida, aunque sólo fue significativo en el tratamiento C10 del primer corte. La mayor absorción de Cu por las raíces se tradujo en una mayor translocación y acumulación del metal en la parte aérea, aunque no se encontraron correlaciones significativas entre la concentración de Cu en la raíz y la de la parte aérea. En otros estudios (Evangelou *et al.*, 2004; Angin *et al.*, 2008) reportaron un aumento en la concentración de Pb y Cd de los tejidos vegetales con mayores dosis de SH.

También se aprecia que la concentración de este metal aumentó en cada tratamiento a lo largo de los cortes, dado el mayor desarrollo de las plantas conforme avanzó el ciclo de cultivo, con una mayor capacidad de absorción de metales.

Figura 38. Concentración de Cu en la parte aérea de vetiveria en los 3 cortes realizados durante el ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos. Media $\pm$ Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo y del mismo corte ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; U = La Unión. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2, 10 y 20 g kg⁻¹.

En cambio, en el suelo de La Unión no se apreciaron diferencias entre los dos tratamientos en los que se pudieron recoger muestras de la parte aérea. No se dispusieron datos sobre los tratamientos UT y U2, ni tampoco del segundo y tercer corte de todos los tratamientos, tal y como se explicó en el apartado 4.4.2, por lo que no pudieron hacerse comparaciones con los tratamientos de menor dosis de SH ni tampoco a lo largo del ciclo de cultivo.

En cuanto al Zn contenido en las raíces de las plantas (Figura 39), se observó una considerable mayor concentración de este metal en las muestras vegetales procedentes del suelo de La Unión, del orden de 10 veces más elevadas que en el caso de El Cuadrón, dados los niveles tan elevados de Zn que posee el suelo de La Unión (Tabla 20).

Figura 39. Concentración de Zn en las raíces de vetiveria al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos. Media $\pm$ Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; U = La Unión. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2, 10 y 20 g kg⁻¹.

La menor disponibilidad de Zn en el suelo (medida mediante *Rhizo*, Tabla 20) al añadir una mayor cantidad de SH sí que se reflejó en este caso con una disminución significativa en la concentración de este metal en las raíces de las plantas cultivadas en ambos suelos. Como ya se explicó en el apartado 4.4.1 la subida de pH causada por el aporte de SH al suelo inmovilizó el Zn de forma que disminuyó la absorción de este metal por las raíces de las plantas. El Zn no presenta la gran afinidad que posee el Cu por la materia orgánica, dada la menor constante de estabilidad de los complejo formados entre el Zn y las sustancias húmicas (Prado *et al.*, 2006), por lo que los compuestos solubles de las SH no consiguieron movilizarlo. Resultados similares fueron observados por Clemente y Bernal (2006), que encontraron que la adición de ácidos húmicos provocó la inmovilización en el suelo del Zn, mientras que el Cu se movilizaba, como ya se comentó anteriormente. Se encontró una correlación fuerte y positiva entre la concentración de Zn en las raíces y su concentración en el

suelo extraída con *Rhizo* ($r = 0,96$, $P < 0,01$), así como una correlación negativa con el pH ($r = -0,55$, $P < 0,05$).

Lo mismo ocurrió con la concentración de Zn en la parte aérea de las plantas (Figura 40): una mayor concentración en las muestras vegetales del suelo de La Unión que en las de El Cuadrón y una disminución significativa en la concentración de Zn al aumentar la dosis de SH. Al igual que con el Cu, también se observó un aumento en dicha concentración a lo largo de los cortes realizados a las plantas durante el cultivo. El contenido de Zn acumulado en la raíz se reflejó en el contenido de la parte aérea. Así, se apreciaron correlaciones positivas aunque débiles entre la concentración en raíz y la concentración en la parte aérea del primer corte ($r = 0,56$, $P < 0,05$), del segundo corte ($r = 0,61$, $P < 0,05$) y del tercer corte ($r = 0,56$, $P < 0,01$).

Figura 40. Concentración de Zn en la parte aérea de vetiveria en los 3 cortes realizados durante el ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos. Media $\pm$ Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo y del mismo corte ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; U = La Unión. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2, 10 y 20 g kg⁻¹.

Como ya se explicó en el apartado 4.4.2, la concentración de Zn en los tejidos vegetales afectó en mayor grado al desarrollo de las plantas que el Cu. De acuerdo con los niveles de toxicidad establecidos por Kabata-Pendias y Pendias (2001), la concentración de Cu de la parte aérea de las plantas se encontró por debajo del nivel inferior en todas las muestras de ambos suelos (20 mg kg^{-1} de Cu). En cambio, en las muestras vegetales del tratamiento U10 del suelo de La Unión se superó ampliamente el nivel superior de Zn establecido (400 mg kg^{-1}), y en el tratamiento U20 el nivel inferior (100 mg kg^{-1} de Zn). Por otro lado, Chen *et al.* (2004) indicaron el umbral de toxicidad para las plantas de vetiveria, siendo de $13\text{-}15 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cu y de más de 880 mg kg^{-1} de Zn en la parte aérea, valores que fueron superados ampliamente en el caso del Zn en el tratamiento U10 de La Unión. Así, las plantas cultivadas en los tratamientos con baja dosis de SH de La Unión no pudieron hacer frente a la elevada toxicidad por este metal, al igual que la de otros metales no determinados en las muestras vegetales, tales como Pb y As. En las muestras de El Cuadrón también se superaron los niveles inferiores de Zn (100 mg kg^{-1}) de Kabata-Pendias y Pendias (2001) en los tratamientos con bajas dosis de SH (CT y C2).

Todas las muestras vegetales presentaron mayor concentración de Zn que de Cu, tanto en la parte aérea como en las raíces. El Zn es un metal con mayor movilidad en el suelo que el Cu y con una mayor facilidad de absorción y translocación y la parte aérea.

Para poder aplicar esta especie vegetal en técnicas de fitorremediación es importante conocer su capacidad de translocación del metal a la biomasa

aérea, la cual es la que va a ser cosechada para poder retirar el metal del suelo si se quiere utilizar para fitoextracción, o bien conocer la acumulación de metal en la raíz si lo que se pretende es aplicar la planta en fitoestabilización. En todos los casos la concentración de Cu en las raíces de las plantas fue muy superior a la concentración en la parte aérea, siendo también superior en las raíces aunque en menor grado en el caso del Zn.

El factor de translocación (FT) refleja bien la capacidad de las plantas de translocar a la parte aérea el metal contenido en las raíces, y se calcula como la concentración de metal en la parte aérea dividido entre la concentración en la raíz (Brooks, 1998). Así, el FT calculado para cada tratamiento en ambos suelos se muestra en la Tabla 21, donde se observa que tanto para el Cu como para el Zn este factor es menor de 1, lo que indica una menor concentración en la parte aérea que en la raíz en todas las muestras, siendo menor el FT del Cu que el del Zn, el cual tiene mayor facilidad para ser transportado a la parte aérea. Estos bajos FT se deben posiblemente a la complejación y secuestro de estos metales en las vacuolas de las células de las raíces, quedando el metal poco disponible para su transporte a la biomasa aérea (Lasat *et al.*, 2000), lo cual es propio de estrategias de exclusión con estos metales (Baker, 1981).

Tabla 21. Factor de translocación (FT) y factor de bioconcentración (FB) de metales en vetiveria cultivada en los diferentes tratamientos.

Tratamientos	FT Cu	FT Zn	FB Cu	FB Zn
CT	0,063	0,70	0,030	2,16
C2	0,065	0,59	0,037	1,81
C10	0,085	0,34	0,049	0,69
C20	0,056	0,39	0,041	0,50
UT	-	-	-	-
U2	-	-	-	-
U10	0,086	0,55	0,016	0,23
U20	0,125	0,13	0,017	0,04

Suelos: C = El Cuadrón; U = La Unión. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2, 10 y 20 g kg⁻¹.

En el suelo de El Cuadrón no se apreció una variación del FT de Cu con los tratamientos aplicados de SH, excepto en los de 10 g kg⁻¹ donde se consiguió una mayor translocación de este metal a la parte aérea. En las muestras de La Unión, el mayor FT se obtuvo en el tratamiento U20.

En cuanto al FT del Zn, en ambos suelos hubo una disminución al añadir mayor cantidad de SH no solo redujo la absorción y acumulación de Zn en la raíz, sino que también disminuyó la capacidad de las plantas para movilizarlo hacia el tejido aéreo.

Valores similares de del FT de Cu y Zn fueron observados por Chen *et al.* (2012) encontrando en la especie vetiveria valores del FT de Cu de 0,03 y del FT de Zn de 0,6, los cuales aumentaron con el uso de agentes quelantes (EDDS, EDTA y ácido cítrico).

En la Tabla 21 también se muestran los valores del factor de bioconcentración (FB) para Cu y Zn, que expresa la capacidad de las plantas

de acumular el metal del suelo y transportarlo a la parte aérea, y que se calcula como la concentración de metal en la parte aérea dividido entre la concentración de metal en el suelo (Brooks, 1998) habiéndose tomado en este estudio la concentración total de metal en el suelo extraído por digestión con agua regia. Valores altos de este factor indican un adecuado aprovechamiento de las plantas en fitoextracción.

Al igual que con el FT, el FB de Cu en el suelo de El Cuadrón fue mayor en el tratamiento con 10 g kg^{-1} de SH, mientras que en las muestras de La Unión no hubo diferencias apreciables.

El FB del Zn, el cual fue también considerablemente mayor que el de Cu, se redujo al añadir dosis mayores de SH en los dos suelos, de la misma forma que lo ocurrido con el FT de este metal. En los tratamientos de El Cuadrón con baja cantidad de SH (CT y C10) se alcanzaron valores de este factor mayores de 1, lo cual indica una elevada concentración de Zn en la parte aérea respecto a la cantidad total de metal contenido en el suelo. Chen *et al.* (2012) también observaron con esta especie valores del FB de Zn de 2,2, reduciéndose con la aplicación de agentes quelantes.

Mendez y Maier (2008) sugirieron valores de FT y FB mayores de 1 para una eficiente aplicación de las plantas en técnicas de fitoextracción, mientras que valores inferiores a 1 indican un mejor aprovechamiento de la especie vegetal en técnicas de fitoestabilización. De acuerdo a los factores calculados, la especie vetiveria no cumplió las condiciones adecuadas para ser aplicada en

fitoextracción. No obstante, sí que podría resultar adecuada si es utilizada para la fitoestabilización de metales en suelos contaminados.

4.4.4. Acumulación total de metales en las plantas de vetiveria

Ya que la medida de la concentración de metales en los tejidos vegetales no tiene en consideración la biomasa producida por la planta, aporta mayor información para evaluar la capacidad de esta especie para técnicas de fitorremediación la determinación de la cantidad de metal acumulado, calculada como la multiplicación de la concentración por el peso seco de las plantas. Esta variable indica la cantidad de metal que ha sido extraída del suelo y que se ha acumulado finalmente en la planta, bien en la raíz o bien en la parte aérea.

En la Figura 41 y Figura 42 se pueden observar las cantidades de Cu acumuladas en las raíces y en la parte aérea de las plantas cultivadas en los diferentes tratamientos con SH.

En el suelo de El Cuadrón, la mayor biomasa y concentración de Cu de las raíces al aumentar la dosis de SH se tradujo en una mayor cantidad de este metal acumulado en la raíz en los tratamientos con altas dosis de SH, resultando significativamente mayor en C20. En la parte aérea, como el peso disminuyó con la dosis de SH, mientras que la concentración de Cu generalmente aumentó, la acumulación de Cu en estos tejidos se mantuvo algo invariable con los tratamientos. El tratamiento C10 fue el único que alcanzó una mayor acumulación aérea de Cu debido a que presentó mayor concentración, aunque dicha diferencia no fue significativa.

Figura 41. Acumulación total de Cu en las raíces de vetiveria al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos. Media $\pm$ Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; U = La Unión. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2, 10 y 20 g kg⁻¹.

Figura 42. Acumulación total de Cu en la parte aérea (suma de los 3 cortes) de vetiveria al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos. Media $\pm$ Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; U = La Unión. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2, 10 y 20 g kg⁻¹.

En las muestras de La Unión, únicamente mostró un aumento significativo en la acumulación radicular de Cu el tratamiento U10, ya que fue el que tuvo mayor biomasa y concentración. En cambio, fue el tratamiento con mayor dosis de SH (U20) el que presentó una mayor acumulación en la parte aérea de este metal, dado el mayor peso seco alcanzado por la planta, no resultando este aumento estadísticamente significativo.

Así, los dos tratamientos con dosis más elevadas de SH (10 ó 20 mg kg⁻¹, dependiendo del suelo) fueron los más efectivos en extraer el Cu del suelo y acumularlo en los tejidos de las plantas. La movilización de Cu por acción de las SH al formar complejos solubles con este metal favoreció su absorción y acumulación en las plantas. En todos los casos, la cantidad de Cu acumulada en la parte aérea, de mayor importancia para fitoextracción, fue considerablemente inferior a la cantidad acumulada en la raíz, la cual es de interés para técnicas de fitoestabilización.

En la Figura 43 y Figura 44 se presentan las cantidades acumuladas de Zn en la raíz y parte aérea de las plantas. Como la concentración de Zn disminuyó considerablemente con la dosis de SH debido al incremento de pH producido, la cantidad acumulada de Zn, tanto en las raíces como en la parte aérea y en ambos suelos, disminuyó significativamente en las dosis más altas de SH. La cantidad acumulada de Zn resultó ser algo mayor en las raíces que en la parte aérea en la mayoría de los casos.

En todo caso, las cantidades totales de metales extraídas del suelo y acumuladas en los tejidos aéreos fueron muy inferiores a las que había en el

suelo, por lo que se requeriría un elevado número de ciclos de cultivo para poder descontaminar estos suelos. Chen *et al.* (2012) también encontraron que la vetiveria acumuló una menor cantidad de metales en la parte aérea en comparación con otras especies, acumulando la mayor parte en las raíces, por lo que sería más adecuada para la fitoestabilización.

Figura 43. Acumulación total de Zn en las raíces de vetiveria al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos. Media $\pm$ Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; U = La Unión. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2, 10 y 20 g kg⁻¹.

Figura 44. Acumulación total de Zn en la parte aérea (suma de los 3 cortes) de vetiveria al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos. Media $\pm$ Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; U = La Unión. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2, 10 y 20 g kg⁻¹.

La especie vetiveria (*Chrysopogon zizanioides*) no resultó ser adecuada en estos casos para ser aplicada en fitoextracción, dado la baja capacidad de translocación de metales a la parte aérea, el escaso desarrollo de las plantas en algunos tratamientos, especialmente en suelos de elevado nivel de contaminación (suelo de La Unión) y la baja cantidad de metal acumulado en la parte aérea. No obstante, la aplicación a estos suelos de elevadas dosis de SH (10-20 g kg⁻¹ SH) consiguió disminuir la biodisponibilidad de Cu y Zn en el suelo y, en el caso del Cu, mejorar la absorción y acumulación de este metal en las raíces de las plantas, lo cual resulta de gran importancia si esta especie se utiliza en técnicas de fitoestabilización de suelos mineros contaminados.

4.5. Ensayo de cultivo con verdolaga

En este ensayo de cultivo se utilizó verdolaga (*Atriplex portulacoides*), especie arbustiva, halófila y con gran tolerancia y capacidad de acumulación de metales. El objetivo fue evaluar la eficiencia de esta especie para recuperar suelos mineros contaminados con metales pesados en combinación con el uso de sustancias húmicas comerciales provenientes de la leonardita americana, mediante técnicas de fitorremediación. Se cultivó esta especie en macetas con mezclas de los suelos mineros descritos anteriormente (El Cuadrón, C; Bustarviejo, B) y diferentes dosis de sustancias húmicas comerciales (SH): 0 (testigo), 2 y 10 g SH kg⁻¹ suelo. En los diferentes tratamientos se estudió la disponibilidad de metales en el suelo, el crecimiento de las plantas y la concentración y acumulación de metales en sus tejidos.

4.5.1. Propiedades de los suelos después del cultivo de verdolaga

Se estudió inicialmente el efecto de las sustancias húmicas sobre la disponibilidad de metales en el suelo. En la Tabla 22 se muestra el pH y la concentración de metales (Cu y Zn) extraídos por el método Rhizo en las mezclas de suelo y sustancias húmicas tras finalizar el ensayo de cultivo.

Tabla 22. Propiedades de los suelos después del cultivo de verdolaga

Tratamiento	pH	Cu Rhizo		Zn Rhizo		
		(mg kg ⁻¹)				
CT	5,1 a	± 0,07	31,5 b	± 0,7	85,9 a	± 7,8
C2	5,2 a	± 0,02	29,4 b	± 0,3	81,0 a	± 5,3
C10	5,7 b	± 0,05	24,0 a	± 0,1	61,2 a	± 3,4
BT	4,1 a	± 0,07	5,4 a	± 0,2	11,4 a	± 1,3
B2	4,3 a	± 0,06	5,0 a	± 0,3	8,6 a	± 0,1
B10	5,7 b	± 0,02	4,7 a	± 0,1	6,1 a	± 0,8

Propiedades de las mezclas de suelo con diferentes dosis de sustancias húmicas tras el cultivo de verdolaga. Media ± Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; B = Bustarviejo. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2 y 10 g kg⁻¹.

En ambos suelos, se observa que la adición de sustancias húmicas en la dosis más elevada (10 g kg⁻¹) provocó un aumento significativo de pH del suelo, dado el elevado pH de esta enmienda orgánica (pH 11).

También se produjo una disminución en la concentración de Cu y Zn extraídos con Rhizo, indicando una reducción en la biodisponibilidad de estos metales, al añadir dosis crecientes de SH al suelo. Sin embargo, únicamente fue significativa la disminución en la concentración de Cu del tratamiento C10.

Como ya se explicó anteriormente en el ensayo de vetiveria, el aumento de pH y la materia orgánica aportada por las sustancias húmicas aumentaron las superficies de adsorción y la carga negativa de las partículas, consiguiendo así una mayor retención de metales y la redistribución de éstos a formas menos lábiles (Shuman, 1999). Sin embargo, y al contrario de lo ocurrido en el ensayo de vetiveria, no se encontraron aquí correlaciones significativas entre el

pH y la concentración de metales extraídos con Rhizo, tanto con el Cu como con el Zn.

Si se comparan las propiedades de los dos suelos, puede observarse que la disponibilidad de Cu y Zn en el suelo de El Cuadrón fue mayor que la del suelo de Bustarviejo, a pesar de que este último presentó una concentración total de metales considerablemente mayor.

4.5.2. Crecimiento de las plantas de verdolaga

La biomasa aérea y radicular de las plantas de verdolaga cultivadas en los tratamientos de los suelos contaminados mezclados con sustancias húmicas se muestra en la Figura 45 y Figura 46.

Figura 45. Peso seco de las raíces de verdolaga al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos. Media $\pm$ Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; B = Bustarviejo. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2 y 10 g kg⁻¹.

Figura 46. Peso seco de la parte aérea de verdolaga al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos. Media $\pm$ Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; B = Bustarviejo. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2 y 10 g kg⁻¹

La biomasa de las plantas, tanto de la parte aérea como de la raíz, fue algo mayor en los tratamientos del suelo de El Cuadrón que en los del suelo de Bustarviejo. Aunque Bustarviejo presentó una menor cantidad de Cu y Zn extraídos con Rhizo, lo que podría indicar una menor disponibilidad, este suelo posee una mayor concentración total de metales como se ha comentado anteriormente, no solo de Cu y Zn, sino también de Pb, Cd y especialmente elevada de As, cuya toxicidad pudo haber afectado negativamente a las plantas debido a su toxicidad.

La adición de una mayor dosis de sustancias húmicas, especialmente los tratamientos con 10 g kg⁻¹, consiguió aumentar de forma significativa el crecimiento de la parte aérea y de las raíces de las plantas en ambos suelos. La aportación de sustancias húmicas, y la consiguiente reducción en la disponibilidad de metales (Tabla 22) y por tanto de su toxicidad, permitió el

desarrollo de mayores rendimientos en las plantas. Así, se observaron correlaciones negativas entre el peso seco de las raíces con la concentración de Cu extraído con Rhizo en el suelo ($r = -0,69$, $P < 0,1$ en El Cuadrón; $r = -0,70$, $P < 0,1$ en Bustarviejo) y con la concentración de Zn en el suelo ($r = -0,71$, $P < 0,1$ en El Cuadrón; $r = -0,79$, $P < 0,1$ en Bustarviejo). También hubo correlaciones negativas entre el peso de la parte aérea y la concentración de Cu en el suelo ($r = -0,79$, $P < 0,05$ únicamente en El Cuadrón) y de Zn en el suelo ($r = -0,66$, $P < 0,1$ en El Cuadrón; $r = -0,78$, $P < 0,1$ en Bustarviejo). En otro trabajo (Pérez-Esteban *et al.*, 2013) también se observó un mayor crecimiento aéreo y radicular en otra especie del mismo género, *Atriplex halimus*, al aportar enmiendas orgánicas a suelos mineros contaminados.

Por otro lado, el peso seco de las raíces también estuvo significativa y negativamente correlacionado con la concentración de Zn en las raíces ($r = -0,69$, $P < 0,01$, considerando los dos suelos juntos); y también se encontró una correlación significativa y negativa entre el peso seco de la parte aérea de las plantas con la concentración de Cu en la parte aérea ($r = -0,71$, $P < 0,01$) y con la concentración de Zn en la parte aérea ($r = -0,69$, $P < 0,01$), lo que indica un mejor desarrollo de las plantas al absorber una menor cantidad de metales.

El aumento de pH que produjo esta enmienda orgánica también pudo haber favorecido el desarrollo de las plantas en estos suelos de elevada acidez. Hubo una correlación fuerte y positiva entre el crecimiento de la raíz y el pH del suelo ($r = -0,80$, $P < 0,01$) y entre el de la parte aérea y el pH ($r = -0,90$, $P < 0,01$).

4.5.3. Concentración de metales en los tejidos vegetales de verdolaga

En la Figura 47 y Figura 48 se muestra la concentración de Cu en las raíces y en la parte aérea, respectivamente, de las plantas de verdolaga cultivadas en los diferentes tratamientos con SH.

Figura 47. Concentración de Cu en las raíces de verdolaga al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos. Media $\pm$ Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; B = Bustarviejo. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2 y 10 g kg⁻¹.

Figura 48. Concentración de Cu en la parte aérea de verdolaga al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos. Media $\pm$ Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; B = Bustarviejo. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2 y 10 g kg⁻¹.

Aunque el suelo de Bustarviejo presentó una menor disponibilidad de metales, se alcanzaron finalmente en los dos suelos concentraciones similares de Cu, tanto en la raíz como en la parte aérea de las plantas.

No obstante, en este caso la biodisponibilidad de Cu en el suelo, determinada mediante el método Rhizo, sí se reflejó de forma óptima en la concentración de Cu de los tejidos vegetales entre los diferentes tratamientos con SH en este ensayo. Así, se observaron disminuciones significativas en la concentración de Cu en raíz y parte aérea en los tratamientos con SH (con 2 y especialmente con 10 g kg⁻¹), donde hubo una menor biodisponibilidad de este metal, en comparación con el testigo sin SH, excepto en las raíces de las plantas del suelo de El Cuadrón, donde no hubo diferencias significativas. Se encontraron correlaciones positivas entre el Cu de la parte aérea con el Cu extraído con Rhizo en el suelo ($r = 0,87$, $P < 0,05$ en El Cuadrón; $r = -0,65$,

$P < 0,1$ en Bustarviejo), aunque no se observaron correlaciones entre la concentración de Cu de las raíces y la concentración en el suelo.

Contrariamente a lo ocurrido en el ensayo con vetiveria, así como en otros estudios (Clemente y Bernal, 2006; Evangelou *et al.*, 2004), la formación de complejos organo-metálicos solubles debido a la aportación de materia orgánica soluble por las SH aplicadas no favoreció la absorción de Cu por las plantas verdolaga. El mayor contenido en materia orgánica y el mayor pH al añadir SH, que por tanto promovieron procesos de adsorción y/o precipitación, así como la aglomeración de los complejos organo-metálicos debido a la formación de puentes de unión por los metales, favorecieron la retención de Cu en el suelo y por tanto redujeron la absorción y acumulación de este metal en las plantas. Así, se encontró una correlación negativa entre el pH del suelo y la concentración de Cu en la parte aérea ($r = -0,75$, $P < 0,01$), aunque no con el Cu de la raíz. Además, en este ensayo se obtuvieron valores de pH menores que en el ensayo de vetiveria, disminuyendo así la solubilidad de la materia orgánica capaz de movilizar el Cu. Otros autores (Duarte *et al.*, 2007) también observaron una disminución en la concentración de algunos metales en los tejidos vegetales de esta especie al añadir otros compuestos orgánicos solubles, como el ácido cítrico. Según estos autores, la complejación del metal podría inhibir su absorción o movilizar el metal en exceso, resultando así de mayor fitotoxicidad.

La concentración de Cu en las raíces de las plantas de Bustarviejo se reflejó bien en la translocación y acumulación de este metal en la parte aérea, encontrando una correlación positiva aunque débil en este suelo entre el Cu en

la raíz y el Cu en la parte aérea ($r = 0,54$, $P < 0,05$), lo cual no ocurrió en el suelo de El Cuadrón.

Un estudio previo (Andrades-Moreno *et al.*, 2013) reportó concentraciones de Cu en verdolaga, cultivada a partir de esquejes en suelos contaminados, similares a las obtenidas en algunos tratamientos este trabajo (630 mg kg^{-1} en raíz, 49 mg kg^{-1} en parte aérea).

En cuanto al Zn, la Figura 49 y Figura 50 muestran la concentración de este metal en las raíces y parte aérea, respectivamente. Al comparar los dos suelos se observa que la concentración de Zn en las raíces de las plantas fue algo mayor en el suelo de Bustarviejo, aunque en la parte aérea la concentración fue bastante similar en ambos suelos.

Figura 49. Concentración de Zn en las raíces de verdolaga al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos. Media $\pm$ Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; B = Bustarviejo. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2 y 10 g kg^{-1} .

Figura 50. Concentración de Zn en la parte aérea de verdolaga al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos. Media $\pm$ Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; B = Bustarviejo. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2 y 10 g kg⁻¹.

En este ensayo con verdolaga, y al igual que lo ocurrido en el de vetiveria, la biodisponibilidad de Zn en el suelo determinada con la extracción Rhizo se relacionó bien con la concentración de este metal en los tejidos de las plantas. Así, en los tratamientos de menor biodisponibilidad, los de mayor dosis de SH, se observaron significativamente menores concentraciones de Zn en las raíces y la parte aérea. Se encontró una correlación fuerte y positiva entre la concentración de Zn en las raíces y su concentración en el suelo extraída con *Rhizo* ($r = 0,92$, $P < 0,05$ en El Cuadrón; $r = 0,88$, $P < 0,05$ en Bustarviejo), aunque no fue significativa la correlación entre el Zn en la parte aérea y el Zn en el suelo. El pH jugó también aquí un papel fundamental en la disponibilidad de Zn y, por tanto, en su absorción por las plantas, encontrando correlaciones negativas entre el pH con la concentración de Zn en la raíz ($r = -0,67$, $P < 0,05$) y con el Zn en la parte aérea ($r = -0,85$, $P < 0,01$).

Al igual que con el Cu, el contenido de Zn acumulado en la raíz se reflejó bien en el de la parte aérea en los tratamientos del suelo de Bustarviejo ($r = 0,85$, $P < 0,01$).

Las concentraciones de Zn alcanzadas en los tejidos de esta planta en este estudio fueron bastante mayores que las reportadas en trabajos previos sobre la misma especie (290 mg kg⁻¹ en raíz y 170 mg kg⁻¹ en parte aérea, Sousa *et al.*, 2008; 550 mg kg⁻¹ en raíz y 50 mg kg⁻¹ en parte aérea; Andrades-Moreno *et al.*, 2013).

En los tratamientos testigo (sin adición de SH) de los dos suelos contaminados, donde el desarrollo de las plantas fue bastante menor, la concentración de Cu en la parte aérea de las plantas se encontró por encima del nivel superior de toxicidad establecido por Kabata-Pendias y Pendias (2001) para este metal (100 mg kg⁻¹). El resto de tratamientos con SH, con menor concentración de Cu en la parte aérea, únicamente superaron el nivel inferior de toxicidad (20 mg kg⁻¹ de Cu). También se superó el nivel superior de toxicidad de Zn (400 mg kg⁻¹) en la parte aérea de las plantas cultivadas en los tratamientos testigo (sin SH) de los dos suelos y en el tratamiento de Bustarviejo con 2 g kg⁻¹ de SH, mientras que el resto de tratamientos sólo superó el nivel inferior de este metal (100 mg kg⁻¹ de Zn). Así, los tratamientos con bajas dosis de sustancias húmicas pudieron suponer para las plantas ciertos problemas de toxicidad por estos metales, tanto por Cu y Zn, y por otros como Cd, Pb y As, especialmente en el suelo de Bustarviejo, donde la concentración de estos metales (y metaloide) fue considerablemente mayor. En todo caso, numerosos estudios señalan que esta especie es muy tolerante a

elevadas concentraciones de metales pesados, como el Cu y el Zn, siendo capaz de producir abundante biomasa y acumular altas cantidades de metales sin sufrir serios efectos fisiológicos adversos (Andrades-Moreno *et al.*, 2013; Cambrollé *et al.*, 2012a; Cambrollé *et al.*, 2012b; Sousa *et al.*, 2008). Esta gran tolerancia se debe a los eficientes mecanismos de detoxificación y compartimentalización que presenta esta especie; los metales están principalmente asociados a la pared celular de las células vegetales, lo que actúa de barrera contra los efectos nocivos de los metales al mantenerlos alejados del citoplasma y otros orgánulos intracelulares con actividad metabólica (Sousa *et al.*, 2008).

Como también ocurrió en las plantas de vetiveria, las de verdolaga presentaron mayor concentración de Zn que de Cu, tanto en la parte aérea como en la raíz, siendo el Zn un metal más móvil en el suelo y, por tanto, más fácilmente absorbido por las plantas y translocado a la parte aérea que el Cu.

Asimismo, las concentraciones de Cu y Zn en las raíces de verdolaga fueron bastante mayores que las de la parte aérea, aunque en el caso del Cu fue en mucho menor grado que lo ocurrido en las plantas de vetiveria. Esto indica una mayor capacidad de translocación de Cu de la raíz a la parte aérea por la verdolaga que por la vetiveria, no así con el Zn. Esta capacidad de translocación se puede cuantificar bien mediante los factores de translocación (FT) para Cu y Zn, mostrados en la Tabla 23 para cada uno de los tratamientos.

Tabla 23. Factor de translocación (FT) y factor de bioconcentración (FB) de metales en verdolaga cultivada en los diferentes tratamientos.

Tratamientos	FT Cu	FT Zn	FB Cu	FB Zn
CT	0,27	0,58	0,47	4,46
C2	0,15	0,41	0,31	2,48
C10	0,05	0,73	0,10	1,72
BT	0,37	0,24	0,17	0,10
B2	0,23	0,37	0,07	0,08
B10	0,15	0,12	0,04	0,03

Suelos: C = El Cuadrón; B = Bustarviejo. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2 y 10 g kg⁻¹.

Se puede observar que los FT de Cu y Zn en todos los tratamientos y suelos fueron menores de 1, indicando una menor concentración de estos metales en la parte aérea que en las raíces. El FT del Zn, metal más móvil y con más facilidad para ser transportado a la parte aérea, fue generalmente mayor que el FT del Cu, aunque no ocurrió así en los tratamientos BT y B10 del suelo de Bustarviejo, donde hubo una mayor translocación de Cu que de Zn. Los resultados de este trabajo concuerdan con los de otros estudios previos en los que también se observaron valores de FT de Cu y Zn < 1, con una mayor concentración de metales en las raíces que en la parte aérea de verdolaga, al restringirse la capacidad de translocación siempre que no se supere cierto umbral en el suelo (Andrades-Moreno *et al.*, 2013; Cambrollé *et al.*, 2012a; Cambrollé *et al.*, 2012b; Sousa *et al.*, 2008). Estos autores sugieren que esto se debe a que estas plantas llevan a cabo una estrategia de exclusión de los metales, inmovilizándolos en la pared celular de las células de las raíces. En estos trabajos también se observó un mayor FT de Zn que de Cu, al ser el Zn de mayor movilidad y biodisponibilidad y, por tanto, con mayor facilidad para ser translocado a la parte aérea.

Sousa *et al.* (2008) obtuvo valores de FT en verdolaga similares a los de este trabajo (FT Cu 0,35-0,50; FT Zn 0,47-0,59), al igual que los obtenidos por Reboredo (2012) en plantas de esta especie recolectadas de hábitats naturales (FT Zn 0,56-0,65).

En FT del Cu disminuyó en ambos suelos conforme se aumentó la dosis de SH. Este material orgánico no sólo redujo la absorción y acumulación de Cu en las raíces, sino que además disminuyó la capacidad de la planta para transportarlo de la raíz a la parte aérea. En cambio, el FT del Zn no mostró ninguna tendencia evidente en cuanto a la dosis de SH añadida, siendo mayor en los tratamientos C10 y B2.

En todo caso, los valores del FT del Cu fueron considerablemente mayores en las plantas de verdolaga que los de la vetiveria. Por tanto, la verdolaga muestra una mayor capacidad de translocación a la parte aérea para este metal que la vetiveria del anterior ensayo. Sin embargo, el FT del Zn alcanzó valores similares a los de las plantas de vetiveria.

La Tabla 23 también muestra los valores del factor de bioconcentración (FB), que representa la capacidad de las plantas de acumular el metal del suelo y transportarlo a la parte aérea. El FB del Cu siguió el comportamiento que el FT, disminuyendo al aumentar la dosis de SH y con valores menores de 1, mostrando así una baja capacidad de extraer el Cu del suelo y acumularlo en la parte aérea. En cambio, el FB del Zn en el suelo de El Cuadrón fue bastante elevado, con valores mayores de 1 y muy superiores a los del Cu, mientras que el FB del Zn en el suelo de Bustarviejo fue muy bajos, con valores similares a

los del Cu. El FB de Zn en los dos suelos también disminuyó al añadir dosis más elevadas de SH.

Los valores de FB de Cu y Zn fueron bastante mayores en las plantas de verdolaga en comparación con las de vetiveria, sobre todo con el Cu. La verdolaga de este ensayo no sólo consiguió una mayor translocación de Cu, sino que también alcanzó concentraciones de Zn bastante mayores en la parte aérea en comparación con la concentración total de este metal en el suelo.

De acuerdo con Mendez y Maier (2008), la verdolaga también resulta más adecuada para técnicas de fitoestabilización que para fitoextracción en el caso del Cu, dados los valores de FT y FB menores de 1. No obstante, los altos valores de FB de Zn podrían indicar su utilidad en fitoextracción de suelos contaminados con Zn, al menos en condiciones como las del suelo de El Cuadrón.

4.5.4. Acumulación total de metales en las plantas de verdolaga

También se determinó la cantidad total de Cu y Zn acumulada en las raíces y la parte aérea de las plantas de verdolaga, teniendo en cuenta a la vez la biomasa de la planta y la concentración de metal en sus tejidos.

En la Figura 51 y Figura 52 se muestra la acumulación de Cu en raíces y parte aérea, respectivamente, en los diferentes tratamientos con SH. A pesar de que la concentración de Cu de la raíz generalmente disminuyera al añadir crecientes dosis de SH (al menos en Bustarviejo), el mayor crecimiento de las plantas consiguió que aumentara significativamente la cantidad total de Cu

acumulado en las raíces de los tratamientos de ambos suelos al aumentar la dosis de SH. Sin embargo, el Cu acumulado en la parte aérea disminuyó significativamente con la dosis de SH en el suelo de El Cuadrón debido a la menor translocación del metal, y en el suelo de Bustarviejo se mantuvo sin diferencias significativas.

Figura 51. Acumulación total de Cu en las raíces de verdolaga al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos. Media $\pm$ Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; B = Bustarviejo. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2 y 10 g kg⁻¹.

Figura 52. Acumulación total de Cu en la parte aérea de verdolaga al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos. Media $\pm$ Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; B = Bustarviejo. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2 y 10 g kg⁻¹.

Los tratamientos con la dosis más elevada de sustancias húmicas (C10 y B10, con 10 g kg⁻¹) fueron los que consiguieron extraer una mayor cantidad de Cu del suelo y acumularlo en los tejidos de las plantas (raíz + parte aérea). Aunque las SH inmovilizaron el metal en el suelo y redujeron su concentración en las plantas, finalmente consiguieron mayores rendimientos en biomasa y por tanto la planta pudo absorber y acumular mayores cantidades de Cu. En cualquier caso, las cantidades acumuladas de este metal en las raíces fueron considerablemente mayores que las acumuladas en la biomasa aérea en todos los tratamientos, aunque especialmente con dosis más altas de SH; lo que hace que esta especie tenga un mayor interés para fitoestabilización, y no para fitoextracción.

En cuanto al Zn, la Figura 53 y Figura 54 muestran la cantidad total acumulada de este metal en la raíz y parte aérea de las plantas.

Figura 53. Acumulación total de Zn en las raíces de verdolaga al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos. Media $\pm$ Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; B = Bustarviejo. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2 y 10 g kg⁻¹.

Figura 54. Acumulación total de Zn en la parte aérea de verdolaga al final del ensayo de cultivo en los diferentes tratamientos. Media $\pm$ Error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo ($P < 0,05$). Suelos: C = El Cuadrón; B = Bustarviejo. Dosis de sustancias húmicas: 0 (T), 2 y 10 g kg⁻¹.

La acumulación total de Zn en la raíz de las plantas disminuyó significativamente, al contrario que el Cu, al aumentar la dosis de SH en los

tratamientos del suelo de El Cuadrón. Sin embargo, en Bustarviejo, la acumulación radicular de este metal fue menor en el tratamiento con 2 g kg^{-1} de SH, dado el bajo desarrollo de biomasa y concentración de Zn en este tratamiento, mientras que la dosis más alta (10 g kg^{-1}) presentó valores similares al testigo sin SH.

La acumulación de Zn en la parte aérea también disminuyó al aumentar la dosis de SH en el suelo de El Cuadrón, siendo el tratamiento C2 el que tuvo un valor significativamente menor. En cambio, en Bustarviejo, la cantidad extraída del suelo y acumulada en la parte aérea fue mayor al aumentar la dosis, siendo B2 el tratamiento significativamente mayor.

Teniendo en cuenta la suma de lo acumulado en la parte aérea y en las raíces, en el suelo de El Cuadrón, la adición de sustancias húmicas redujo la extracción de Zn del suelo y su acumulación en los tejidos de las plantas, mientras que en Bustarviejo el tratamiento con mayor dosis de SH consiguió un ligero aumento en esta cantidad extraída y acumulada de Zn. Igual que con el Cu, las cantidades acumuladas de Zn fueron mayores en las raíces que en la parte aérea, resultando de mayor utilidad para fitoestabilización.

Las plantas de verdolaga de este ensayo consiguieron acumular cantidades de Cu muy similares a las de vetiveria del ensayo anterior. Sin embargo, vetiveria consiguió mayores acumulaciones de Zn en sus tejidos debido a la mayor biomasa alcanzada por esta planta, lo cual indica una mayor potencial utilidad de vetiveria que verdolaga para la descontaminación de suelo mediante técnicas de fitorremediación.

De todas formas, las cantidades totales de metales extraídas del suelo y acumuladas en la parte aérea de las plantas de verdolaga fueron también muy inferiores a las que había en el suelo, por lo que sería necesario un número de ciclos de cultivo muy elevado, especialmente en el suelo de Bustarviejo, para poder reducir la concentración de metales en estos suelos hasta niveles inferiores a los establecidos por la legislación para suelos potencialmente contaminados. Por ello, la aplicación de esta especie en técnicas de fitoextracción no resultaría adecuada. En cambio, la mayor acumulación de metales alcanzada en las raíces, especialmente al añadir sustancias húmicas como enmienda, hacen de verdolaga una herramienta útil para fitoestabilización. Estudios previos (Mendez *et al.*, 2007; Pérez-Esteban *et al.*, 2013) también han propuesto otras especies del género *Atriplex* como valiosas candidatas para la fitoestabilización de zonas mineras contaminadas.

En resumen, la especie de verdolaga (*Atriplex portulacoides*) resultó, al igual que la vetiveria, más adecuada para utilizarla en técnicas de fitoestabilización, en vez de fitoextracción, debido a su escaso desarrollo en suelos contaminados con altos contenidos de metales pesados y la baja cantidad de metales acumulados en la parte aérea. No obstante, la aplicación de sustancias húmicas derivadas de la leonardita (sobre todo en dosis de 10 g kg⁻¹) también consiguió reducir la biodisponibilidad de metales en el suelo, aumentar la biomasa aérea y radicular de estas plantas y, aunque disminuyó la concentración de metales en los tejidos, también permitió alcanzar una mayor cantidad de Cu extraído del suelo y acumulado en las raíces, lo cual resulta óptimo para su utilización en fitoestabilización.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

En el estudio llevado a cabo con sustancias húmicas comerciales, no se apreciaron diferencias significativas entre usar la formulación líquida o sólida. Su eficacia y forma de acción resultó muy similar.

La aplicación de las sustancias húmicas en el suelo de La Unión (Murcia), inmovilizó los metales pesados estudiados, lo que podría ser una ventaja de cara a la fitorremediación debido a su alto grado de contaminación. Se determina que esta inmovilización se debe a la formación de complejos de esfera interna que se forman mediante el desprendimiento de protones, lo que mantiene la solución del suelo a pH relativamente ácido.

En El Cuadrón y Garganta de los Montes las SH son capaces de movilizar los metales pesados, haciéndolos más disponibles para las plantas. Cuanto mayor es la dosis, mayor es la cantidad de Cu y Cd extraído. Por el contrario la dosis más elevada extrae menor cantidad acumulada de Zn y Pb. A medida que se incrementa el número de extracciones, se extrae menor cantidad de metales debido a que cada vez van quedando las fracciones más recalcitrantes. En ambos casos, los suelos son aptos para ser recuperados mediante fitoextracción.

Las sustancias húmicas movilizaron mayores cantidades de Cu que de cualquier otro de los metales estudiados, lo que era de esperar, basándonos en las propiedades de los metales (carga y tamaño del ion hidratado, potencial iónico (carga/radio), electronegatividad de Pauling). El Cu y el Pb son mayores competidores por los grupos reactivos que Cd o Zn..

En los ensayos en invernadero se observó que la especie vetiveria (*Chrysopogon zizanioides*) no resulta adecuada para ser aplicada en técnicas de fitoextracción en los suelos de este estudio, debido a su limitada capacidad de translocación de metales a la parte aérea, el escaso desarrollo de biomasa en suelos de elevado nivel de contaminación (como el de La Unión) y la baja cantidad de metal acumulado en la parte aérea. Sin embargo, la aplicación de elevadas dosis de SH (10-20 g kg⁻¹) consiguió disminuir la biodisponibilidad de Cu y Zn en el suelo, potenciar el crecimiento de las plantas y, en el caso del Cu, mejorar la capacidad de absorción y acumulación de este metal en las raíces de las plantas. Así, la utilización de vetiveria en combinación con altas dosis de sustancias húmicas resulta de gran interés para ser utilizada en técnicas de fitoestabilización de suelos mineros contaminados.

Por otro lado, la especie verdolaga (*Atriplex portulacoides*) también resultó, al igual que vetiveria, de mayor utilidad para técnicas de fitoestabilización que para fitoextracción. Su utilización en combinación con elevadas dosis de sustancias húmicas comerciales (10 g kg⁻¹) consiguió también en este caso potenciar el crecimiento de biomasa de las plantas y aumentar la acumulación de Cu en las raíces, alcanzando cantidades acumuladas de este metal similares a las de vetiveria. Sin embargo, el menor desarrollo de biomasa de la verdolaga no permitió alcanzar la cantidad acumulada de Zn que consiguió la vetiveria.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón-Corredor, O. M., 2009. Los elementos traza. Revista Médica de la Extensión Portuguesa 4:107-124.
- Alloway, B. J., 1995. Heavy metals in soils, 2nd edition. Blackie Academic and Professional, London.
- Andra, S. S., Datta, R., Sarkar, D., Makris, K. C., Mullens, C. P., Sahi, S. V., Bach, S. B., 2009. Induction of lead-binding phytochelatins in Vetiver Grass [*Vetiveria zizanioides* (L.)]. Journal of Environmental Quality 38:868-877.
- Andrades-Moreno, L., Cambrollé, J., Figueroa, M. E., Mateos-Naranjo, E., 2013. Growth and survival of *Halimione portulacoides* stem cuttings in heavy metal contaminated soils. Marine Pollution Bulletin 75:28–32.
- Angin, I., Turan, M., Ketterings, Q. M. Cakici, A., 2008. Humic acid addition enhances B and Pb phytoextraction by Vetiver Grass (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash). Water, Air, & Soil Pollution 188:335-343.
- Antón-Pacheco, C., Gumiel, J., de Miguel, E., López, E., Gómez, J., Giménez, M., Rejas, J., 1999. Cartografía del vertido de lodos de la mina de Aznalcóllar mediante imágenes Daedalus ATM. Revista de Teledetección 12:13-19.
- Ashworth, D. J., Alloway, B. J., 2008. Influence of dissolved organic matter on the solubility of heavy metals in sewage-sludge-amended soils. Communications in Soil Science and Plant Analysis 39:538-550.
- Baker, A. J. M., 1981. Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. Journal of Plant Nutrition 3:643-654.
- Baker, A.J.M, Brooks, R.R., 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements: A review of their distribution, ecology and phytochemistry. Biorecovery 1:81-108.
- Balnois, E., Wilkinson, K. J., Lead, J. R., Buffle, J., 1999. Atomic force microscopy of humic substances: effects of pH and ionic strength. Environmental Science & Technology 33:3911–3917.
- Barceló, J., Poschenrieder, C., 1992. Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. Suelo y Planta 2:345-361.
- Becerril Soto, J. M., Barrutia Sarasua, O., García Plazaola, J. I., Hernández Hernández, A., Olano Mendoza, J. M., Garbisu Crespo, C., 2007. Especies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación. Ecosistemas 16:50-55.

- BOCM, 1999. Decreto 326/1999, de 18 de noviembre, por el que se regula el régimen jurídico de los suelos contaminados de la Comunidad de Madrid. BOCM, de 25 de noviembre de 1999, 280, pp. 6-9.
- BOCM, 2006. Orden 2770/2006, de 11 de agosto, de la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, por la que se procede al establecimiento de niveles genéricos de referencia de metales pesados y otros elementos traza en suelos contaminados de la Comunidad de Madrid. BOCM, de 28 de agosto de 2006, 204, pp. 29-30.
- BOE, 1990. Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario. BOE, de 1 de noviembre de 1990, 262, pp. 32339-32340.
- BOE, 1995. Resolución de 28 de abril de 1995, de la Secretaría de Estado de Medio Ambiente y Vivienda, por la que se dispone la publicación del acuerdo del Consejo de Ministros de 17 de febrero de 1995, por el que se aprueba el Plan Nacional de Recuperación de Suelos Contaminados. BOE, de 13 de mayo de 1995, 114, pp. 13926-13930.
- BOE, 1998. Ley 10/1998, de 21 de abril, de Residuos. BOE, de 22 de abril de 1998, 96, pp. 13372-13384.
- BOE, 2005. Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. BOE, de 18 de enero de 2005, 15, pp. 1833-1843.
- Brooks, R.R., 1998. Plants that hyperaccumulate heavy metals. CAB International, Wallingford.
- Buffle, J., Leppard, G., 1995. Characterization of Aquatic Colloids and Macromolecules 1. Structure and Behavior of Colloidal Material, Environ. Environmental Science & Technology 29:2169-2175.
- Cabrillo, F., 1994. Industrialización y derecho de daños en la España del siglo XIX. Revista de Historia Económica/Journal of Iberian and Latin American Economic History (Second Series) 12:591-609.
- Cambrollé, J., Mancilla-Leytón, J. M., Muñoz-Vallés, S., Luque, T., Figueroa, M. E., 2012a. Tolerance and accumulation of copper in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. Marine Pollution Bulletin 64:721–728.
- Cambrollé, J., Mancilla-Leytón, J. M., Muñoz-Vallés, S., Luque, T., Figueroa, M. E., 2012b. Zinc tolerance and accumulation in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. Chemosphere 86:867–874.

- Carpena Ruiz, R. O., Bernal Calderón, M. P., 2007. Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Ecosistemas* 16:1-3.
- Céspedes Miranda, E. M., Hernández Lantigua, I., Llopiz Janer, N., 1996. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 15.
- Chen, Y., Shen, Z., Li, X., 2004. The use of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*) in the phytoremediation of soils contaminated with heavy metals. *Applied Geochemistry* 19:1553-1565.
- Chen Y., Wang, C.; Wang, G., Luo, C., Mao, Y., Shen, Z., Li, X. 2008. Heating treatment schemes for enhancing chelant-assisted phytoextraction of heavy metals from contaminated soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27:888-896.
- Chen, K. F., Yeh, T. Y., Lin, C. F., 2012. Phytoextraction of Cu, Zn, and Pb Enhanced by Chelators with Vetiver (*Vetiveria zizanioides*): Hydroponic and Pot Experiments. *ISRN Ecology* 2012:1–12.
- Clemente, R., Bernal, M. P., 2006. Fractionation of heavy metals and distribution of organic carbon in two contaminated soils amended with humic acids. *Chemosphere* 64:1264–1273.
- Cortés Páez, L. E., Bravo Realpe, I. S., Martín Peinado, F. J., Menjivar Flores, J. C., 2015. Adsorption of heavy metals in andisols, vertisols and humic acids. *Acta Agronómica* 64:61-71.
- Danh, L. T., Truong, P., Mammucari, R., Tran, T., Foster, N., 2009. Vetiver grass, *Vetiveria zizanioides*: a choice plant for phytoremediation of heavy metals and organic wastes. *International Journal of Phytoremediation* 11:664-691.
- Datta, R., Quispe, M. A., Sarkar, D., 2011. Greenhouse Study on the Phytoremediation Potential of Vetiver Grass, *Chrysopogon zizanioides* L., in Arsenic-Contaminated Soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 86:124–128.
- Day, P. R., 1965. Particle fractionation and particle-size analysis. En: Black, C. A. (Ed.), *Methods of soil analysis, Part 1*. American Society of Agronomy, Madison, pp. 545-567.
- De la Rosa-Pérez, D. A., Teutli-León, M., Margarita, M., Ramírez-Islas, M. E., 2007. Electrorremediación de suelos contaminados, una revisión técnica para su aplicación en campo. *Revista internacional de contaminación ambiental* 23:129-138.

- Díaz Suárez, V., Páez Pérez, C., 2011. Contaminación por material particulado en Quito y caracterización química de las muestras. *Revista Acta Nova* 3:308-322.
- Do Nascimento, C. W. A., Amarasiriwardena, D., Xing, B., 2006. Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. *Environmental Pollution* 140:114-123.
- DOCE, 1986. Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas 86/278/CEE, de 12 de junio de 1986, relativa a la protección del medio ambiente, y en particular, de los suelos, en la utilización de lodos de depuradora en agricultura. DOCE, de 4 de julio de 1986, L181, pp. 6-12.
- Drescher, A. W., May, T., 1989. Técnicas tradicionales de protección del suelo, paisajes abancalados modernos y erosión en la costa granadina. *Revista de estudios andaluces* 13:103-116.
- Duarte, B., Delgado, M., Caçador, I., 2007. The role of citric acid in cadmium and nickel uptake and translocation, in *Halimione portulacoides*. *Chemosphere* 69:836–840.
- Ducceschi, L., Marras, A., Legittimo, P. C., 2001. Some preliminary observations on zinc and cadmium accumulative capacity in *Arum italicum* Mill. *Chemistry and Ecology* 17:255-270.
- El-Eswed, B., Khalili, F., 2006. Adsorption of Cu (II) and Ni (II) on solid humic acid from the Azraq area, Jordan. *Journal of colloid and interface science*, 299:497-503.
- Encabo, C., Cala, V., Gutiérrez-Maroto, A., 1997. Evaluación de la dispersión de metales pesados en suelos del entorno de una mina, mediante el método de especiación secuencial química. *Boletín Geológico y Minero* 108:57-68.
- Evangelou, M. W. H., Daghan, H., Schaeffer, A., 2004. The influence of humic acids on the phytoextraction of cadmium from soil. *Chemosphere* 57:207-213.
- Feng, M. H., Shan, X. Q., Zhang, S. Z., Wen, B., 2005a. A comparison of the rhizosphere-based method with DTPA, EDTA, CaCl₂, and NaNO₃ extraction methods for prediction of bioavailability of metals in soil to barley. *Environmental Pollution* 137:231-240.
- Feng, M. H., Shan, X. Q., Zhang, S. Z., Wen, B., 2005b. Comparison of a rhizosphere-based method with other one-step extraction methods for assessing the bioavailability of soil metals to wheat. *Chemosphere* 59:939-949.

- Franco, J. A., Bañón, S. 1991. Posibilidades agrícolas de los «ácidos húmicos» comerciales. *Horticultura* 61:44-53.
- Garbisu, C., Alkorta, I., 2001. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology* 77:229-236.
- Ginocchio, R., Baker, A. J. M., 2004. Metallophytes in Latin America: A remarkable biological and genetic resource scarcely known and studied in the region. *Revista Chilena de Historia Natural* 77:185–194.
- Ginocchio, R., Narváez, J., 2002. Importancia de la forma química y de la matriz del sustrato en la toxicidad por cobre en *Noticastrum sericeum* (Less.). *Revista Chilena de Historia Natural* 75:603-612.
- González, I., Muenia, V., Cisternas, M., Neaman, A., 2008. Acumulación de cobre en una comunidad vegetal afectada por contaminación minera en el valle de Puchuncaví, Chile central. *Revista Chilena de Historia Natural* 81:279-291.
- Granados, L., Bornemisza, E., 1991. Efecto de las concentraciones de cobre en el suelo sobre los contenidos de nutrimentos en plantas de almácigo de café Cv. Catuai rojo. *Agronomía Costarricense* 15:51-55.
- Halim, M., Conte, P., Piccolo, A., 2003. Potential availability of heavy metals to phytoextraction from contaminated soils induced by exogenous humic substances. *Chemosphere* 52:265-275.
- Herrera Murillo, J., Rodríguez Román, S., 2010. Validación de un método de análisis para la determinación de metales pesados en partículas pM10 colectadas en aire ambiente. *Tecnología en Marcha* 23:33-46.
- Huitson, S. B., Macnair, M. R., 2003. Does zinc protect the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* from herbivory by snails? *New Phytologist* 159:453-459.
- Islam, M. P., Bhuiyan, M. K. H., Hossain, M. Z., 2008. Vetiver grass as a potential resource for rural development in Bangladesh. *Agricultural Engineering International: CIGR E-Journal, Invited Overview* 5:1-18.
- ISO 11466, 1995. Soil quality: extraction of trace elements soluble in aqua regia. International Organization for Standardization, Geneva.
- Jara-Peña, E., Gómez, J., Montoya, H., Chanco, M., Mariano, M., Cano, N., 2014. Capacidad fitorremediadora de cinco especies altoandinas de suelos contaminados con metales pesados. *Revista peruana de biología* 21:145-154.

- Jiménez, R., Jordá, L., Jordá, R., Prado, P., 2004. La minería metálica en Madrid desde 1417 hasta nuestros días. *Bocamina* 14:50-89.
- Jones, M. N., Bryan, N. D., 1998. Colloidal properties of humic substances. *Advances in Colloid and Interface Science* 78:1–48.
- Jordá, L., Jordá, A., 2005. La mina de plata de Bustarviejo. Modelos de gestión e intervención del patrimonio geológico y minero. *Industria y minería* 361:38-40.
- Jordá, L., 2008. La minería de los metales en la provincia de Madrid: patrimonio minero y puesta en valor del espacio subterráneo. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace elements in soils and plants, 3rd edition. CRC Press, Boca Raton.
- Keller, C., Hammer, D., 2005. Alternatives for phytoextraction: biomass plants versus hyperaccumulators. *Geophysical Research Abstracts* 7:03285.
- Kidd, P. S., Becerra, C., García Lestón, M., Monterroso, C., 2007. Aplicación de plantas hiperacumuladoras de níquel en la fitoextracción natural: el género *Alyssum* L. *Ecosistemas* 16:26-43.
- Kononova, M. M., Bel'Chikova, N. P., 1961. Quick methods of determining the humus composition of mineral soils. *Soviet Soil Science* 10:1112–1121.
- Lasat, M. M., Pence, N. S., Garvin, D. F., Kochian, L. V., 2000. Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany* 51:71-79.
- Lázaro, A., Villar, B., Aceituno-Mata, L., Tardío, J., De la Rosa, L., 2013. The Sierra Norte of Madrid: an agrobiodiversity refuge for common bean landraces. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60:1641–1654.
- Lebeau, T., Braud, A., Jézéquel, K., 2008. Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: a review. *Environmental Pollution* 153:497–522.
- López Gutierrez, J., García Menéndez, O., Grima Olmedo, J., Ballesteros Navarro, B., Pérez Gago, M., 2001. Técnicas de Biorrecuperación in situ en acuíferos contaminados por metales pesados. En: Investigación, gestión y recuperación de acuíferos contaminados. IGME, Madrid, pp. 233-243.
- Ma, L. Q., Rao, G. N., 1997. Chemical fractionation of cadmium, copper, nickel, and zinc in contaminated soils. *Journal of Environmental Quality* 26:259-264.

- Macías, F., 2004. Recuperación de suelos degradados, reutilización de residuos y secuestro de Carbono. Una alternativa integral de mejora de la calidad ambiental. *Recursos Rurais* 1:49-56.
- Macnair, M. R., 2003. The hyperaccumulation of metals by plants. *Advances in Botanical Research* 40:63–105.
- Magdaleno, A., de Cabo, L., Arreghini, S., Salinas, C., 2014. Assessment of heavy metal contamination and water quality in an urban river from Argentina. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology* 18:113-120.
- Majzik, A., Tombácz, E., 2007. Interaction between humic acid and montmorillonite in the presence of calcium ions II. Colloidal interactions: Charge state, dispersing and/or aggregation of particles in suspension. *Organic Geochemistry* 38:1330–1340.
- M.A.P.A., 1994. *Métodos Oficiales de Análisis*, Tomo III. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- Martín Moreno, C., González Becerra, A., Blanco Santos, M. J., 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Revista Iberoamericana de Micología* 21:103-120.
- Martínez-Martínez, S., Acosta, J. A., Faz Cano, A., Carmona, D. M., Zornoza, R., Cerda, C., 2013. Assessment of the lead and zinc contents in natural soils and tailing ponds from the Cartagena-La Unión mining district, SE Spain. *Journal of Geochemical Exploration* 124:166–175.
- McBride, M., 1989. Reactions controlling heavy metals solubility in soils. *Advances in soil science* 10:1-56.
- McBride, M. B., 1994. *Environmental chemistry of soils*. Oxford University Press, New York.
- McGrath, S. P., Zhao, F. J., 2003. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology* 14:277–282.
- Mendez, M. O., Glenn, E. P., Maier, R. M., 2007. Phytostabilization potential of quailbush for mine tailings: growth, metal accumulation, and microbial community changes. *Journal of Environmental Quality* 36:245–253.
- Mendez, M. O., Maier, R. M., 2008. Phytoremediation of mine tailings in temperate and arid environments. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 7:47-59.

- Mendoza-Amézquita, E., Armienta-Hernández, M. A., Ayora, C., Soler, A., Ramos-Ramírez, E., 2006. Potencial lixiviación de elementos traza en jales de las minas La Asunción y Las Torres, en el Distrito Minero de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 23:75-83.
- Morán, R., 2001. Aproximaciones al costo económico de impactos ambientales en la minería. *Revista Ambiente y Desarrollo* 17:59-67.
- Navarro-Aviñó, J. P., Aguilar Alonso, I., López-Moya, J. R., 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Revista Ecosistemas* 16:10-25.
- Nelson, D. W., Sommers, L. E., 1996. Total Carbon, Organic Carbon, and Organic Matter. En: Sparks, D. L. (Ed.), *Methods of soil analysis, Part 3. Chemical Methods*. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, pp. 961-1010.
- Oliver, M., 2009. Efectos fisiológicos de las sustancias húmicas sobre los mecanismos de toma de hierro en plántulas de tomate. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante, Alicante.
- Ong, H. L., Bisque, R. E., 1968. Coagulation of humic colloids by metal ions. *Soil Science* 106:220–224.
- Pastor, J., Aparicio, A. M., Gutiérrez-Maroto, A., Hernández, A. J., 2007. Effects of two chelating agents (EDTA and DTPA) on the autochthonous vegetation of soil polluted with Cu, Zn and Cd. *Science of the Total Environment* 378:114-118.
- Pence, N. S., Larsen, P. B., Ebbs, S. D., Letham, D. L., Lasat, M. M., Garvin, D. F., Eide, D., Kochian, L. V., 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:4956-4960.
- Pérez-Esteban, J., Escolástico, C., Ruiz-Fernández, J., Masaguer, A., Moliner, A., 2013. Bioavailability and extraction of heavy metals from contaminated soil by *Atriplex Halimus*. *Environmental and Experimental Botany* 88:53–59.
- Piccolo, A., Conte, P., Cozzolino, A., Spaccini, R., 2001. Molecular sizes and association forces of humic substances in solution. En: Clapp, C. E., Hayes *et al.* (Eds.), *Humic substances and chemical contaminants*. Soil Science Society of America, Madison, pp. 89-118.
- Prado A. G. S., Torres J. D., Martins P. C., Pertusatti J., Bolzon L. B., Faria E. A., 2006. Studies on copper(II)- and zinc(II)-mixed ligand complexes of humic acid. *Journal of Hazardous Materials* B136:585–588.

- Prasad, M., 1995. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environmental and Experimental Botany* 35:525-545.
- Prieto Méndez, J., González Ramírez, C. A., Román Gutiérrez, A. D., Prieto García, F., 2009. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10:29-44.
- Puga, S., Sosa, M., Lebgue, T., Quintana, C., Campos, A., 2006. Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera: Heavy metals pollution in soils damaged by mining industry. *Ecología Aplicada* 5:149–155.
- Ramos Ruiz, R., 2000. Aplicación de sustancias húmicas comerciales como productos de acción bioestimulante: efectos frente al estrés salino. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante, Alicante.
- Reboredo, F., 2012. Zinc compartmentation in *Halimione portulacoides* (L.) Aellen and some effects on leaf ultrastructure. *Environmental Science and Pollution Research* 19:2644–2657.
- Rhoades, J. D., 1982. Cation exchange capacity. En: Page, A. L., *et al.* (Eds.), *Methods of soil analysis, Part 2: Chemical and microbiological properties*, second ed. American Society of Agronomy, Madison, pp. 149-164.
- Rondón, J. A., Vidal, R., 2005. Establecimiento de la cubierta vegetal en áreas degradadas (principios y métodos). *Revista Forestal Latinoamericana* 38:63-82.
- Salas-Luevano, M., Manzanares–Acuña, E., Letechipía–de León, C., Vega-Carrillo, H., 2009. Tolerant and hyperaccumulators autochthonous plant species from mine tailing disposal sites. *Asian Journal of Experimental Sciences* 23:27-32.
- Schulten, H.R., Schnitzer, M., 1993. A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften* 80:29-30.
- Schwab, A. P., Zhu, D. S., Banks, M. K., 2007. Heavy metal leaching from mine tailings as affected by organic amendments. *Bioresource Technology* 98:2935-2941.
- Shuman, L. M., 1999. Organic waste amendments effect on zinc fractions of two soils. *Journal of Environmental Quality* 28:1442-1447.
- Sousa, A. I., Caçador, I., Lillebø, A. I., Pardal, M. A., 2008. Heavy metal accumulation in *Halimione portulacoides*: Intra- and extra-cellular metal binding sites. *Chemosphere* 70:850–857.

- Sparks, D. L., 2003. Environmental soil chemistry, 2nd edition. Academic Press, San Diego.
- Sposito, G., 1984. The surface chemistry of soils. Oxford University Press. New York.
- Sposito, G., 1989. The Chemistry of Soils. Oxford University Press, New York.
- Stevenson, F. J., 1982. Humus Chemistry. Wiley, New York.
- Stevenson, F. J., Fitch, A., 1994. Chemistry of complexation of metal ions with soil solutions organics. En: Huang, P. M., Schnitzer, M. (Eds.), Interaction of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes, S.S.S.A. Special Publications 17. Soil Science Society of America, Madison, pp. 29–58.
- Tessier, A., Campbell, P. G. C., Bisson, M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. Analytical Chemistry 51:844-851.
- Tipping, E., 2002. Cation binding by humic substances. Cambridge University Press, Cambridge.
- Truong, P., 1999. Vetiver grass technology for mine rehabilitation. Technical Bulletin No. 1999/2. Pacific Rim Vetiver Network, Office of the Royal Development Projects Board, Bangkok.
- Truong, P., Pinners, E., Tan Van, T., 2009. Aplicaciones del sistema vetiver, manual técnico de referencia. CreateSpace Independent Publishing Platform, Seattle.
- Turan, M., Angin, I., 2004. Organic chelate assisted phytoextraction of B, Cd, Mo and Pb from contaminated soils using two agricultural crop species. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science 54:221-231.
- US Environmental Protection Agency, 1996. Acid Digestion of Sediments, Sludges and Soils, Method 3050B. En: Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods, SW-846. Environmental Protection Agency of United State of America (EPA), Washington, DC.
- Volke, T., Velasco, J. A., De la Rosa, D. A., 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, México D.F.
- Wagner, S., Truong, P., Vieritz, A., 2003. Response of vetiver grass to extreme nitrogen and phosphorus supply. Proceedings of the Third International Conference on Vetiver and Exhibition, Guangzhou, China.

- Whiting, S., Reeves, R. D., Richards, D., Johnson, M. S., Cooke, J. A., Malaisse, F., Paton, A., Smith, J. A. C., Angle, J. S., Chaney, R. L., 2004. Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. *Restoration Ecology* 12:106-116.
- Wong, M., 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated Soils. *Chemosphere* 50:775-780.
- Xu, W., Li, W., He, J., Singh, B., Xiong, Z., 2009. Effects of insoluble Zn, Cd, and EDTA on the growth, activities of antioxidant enzymes and uptake of Zn and Cd in *Vetiveria zizanioides*. *Journal of Environmental Sciences* 21:186–192.
- Zheng, C. R., Tu, C., Chen, H. M. 1997. Preliminary study on purification of eutrophic water with vetiver. International Vetiver Grass Technology Workshop, Fuxhou, China.